

Aus dem Veterinärwissenschaftlichen Department der Tierärztlichen  
Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München

Arbeit angefertigt unter der Leitung von Prof. Dr. Thomas Göbel

Angefertigt am Deutschen Herzzentrum München, Klinik an der Techni-  
schen Universität München und am Klinikum Großhadern der Ludwig-  
Maximilians-Universität München

(Prof. Dr. Steffen Massberg)

**Einfluss tumoröser Mikropartikel auf die  
Entstehung tiefer Venenthrombosen im murinen  
Stenosemodell**

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde  
der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München

von Irene Heike Schubert  
aus Schweinfurt

München 2013

Gedruckt mit der Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät der  
Ludwig-Maximilians-Universität München

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Joachim Braun

Berichterstatte: Univ.-Prof. Dr. Thomas Göbel

Korreferenten: Univ.-Prof. Dr. Johannes Hirschberger  
Univ.-Prof. Dr. Walter Hermanns  
Priv.-Doz. Dr. Gerhard Wess  
Univ.-Prof. Dr. Bernhard Aigner

Tag der Promotion: 20.07.2013

**Meinem Vater**

## INHALTSVERZEICHNIS

|  |          |
|--|----------|
| <b>I. EINLEITUNG .....</b>   | <b>1</b> |
| <b>II. LITERATURÜBERSICHT .....</b>                                      | <b>2</b> |
| 1. Venöse Thrombose .....  | 2        |
| 1.1 Definition .....   | 2        |
| 1.2 Bau venöser Gefäße .....   | 2        |
| 1.3 Entstehung eines venösen Thrombus .....                              | 4        |
| 1.3.1 Hyperkoagulabilität .....  | 4        |
| 1.3.2 Endothelschaden .....  | 4        |
| 1.3.3 Änderung der Hämodynamik .....                                     | 5        |
| 1.4 Venöse Thrombosemodelle bei Labornagern .....                        | 6        |
| 1.4.1 Eisenchlorid-Modell .....  | 6        |
| 1.4.2 Venöse Stase .....   | 7        |
| 1.4.3 Venöse Stenose .....   | 7        |
| 1.4.4 Elektrolytische Gefäßverletzung .....                              | 8        |
| 1.5 Aufbau venöser Thromben .....  | 8        |
| 1.5.1 Aufbau humaner venöser Thromben .....                              | 8        |
| 1.5.2 Aufbau Stenose-induzierter muriner venöser Thromben .....          | 9        |
| 1.6 Klinische Relevanz venöser Thrombosen .....                          | 10       |
| 2. Thrombozyten .....  | 11       |
| 2.1 Definition .....   | 11       |
| 2.2 Relevante Rezeptoren .....   | 11       |
| 2.2.1 GPIb-IX-V .....  | 11       |
| 2.2.2 GPIIb-IIIa ( $\alpha_{IIb} \beta_3$ ) .....                        | 12       |
| 2.2.3 P-Selektin .....   | 12       |
| 2.3 Rolle der Thrombozyten für die Entstehung der venösen Thrombose .... | 13       |
| 3. Leukozyten .....  | 14       |
| 3.1 Definition .....   | 14       |
| 3.2 Adhäsionskaskade .....   | 15       |
| 3.3 Subpopulationen .....  | 16       |



|  |           |
|--|-----------|
| Inhaltsverzeichnis   | II        |
| 3.3.1 Monozyten .....  | 16        |
| 3.3.2 Neutrophile Granulozyten.....  | 17        |
| 3.4 Rolle der Leukozyten für die Entstehung der venösen Thrombose .....                              | 18        |
| 3.4.1 Beitrag von Monozyten.....   | 18        |
| 3.4.2 Beitrag von Neutrophilen .....   | 19        |
| 4. Mikropartikel .....   | 19        |
| 4.1 Definition .....   | 19        |
| 4.2 Herkunft und Funktion.....   | 20        |
| 4.3 Thrombogene Mikropartikel .....  | 21        |
| 4.3.1 Monozytäre Mikropartikel .....   | 21        |
| 4.3.2 Thrombozytäre Mikropartikel .....  | 21        |
| 4.3.3 Granulozytäre Mikropartikel .....  | 22        |
| 4.3.4 Endotheliale Mikropartikel .....   | 22        |
| 4.4 Bedeutung für die Entstehung der venösen Thrombose .....   | 22        |
| 4.4.1 Thrombusinitiierung .....  | 22        |
| 4.4.2 Thrombusprogression .....  | 23        |
| 5. Tissue factor .....   | 23        |
| 5.1 Definition .....   | 23        |
| 5.2 Funktion – Koagulationskaskade .....   | 24        |
| 5.3 Regulation der Aktivität .....   | 25        |
| 5.4 Rolle für die Entstehung der venösen Thrombose.....  | 26        |
| 6. Venöse Thrombose und Tumorleiden .....  | 27        |
| 6.1 Venöse Thrombose bei Tumorpatienten.....   | 27        |
| 6.2 Mikropartikel bei venöser Thrombose .....  | 28        |
| <b>III. ZIELSETZUNG.....</b>   | <b>30</b> |
| 1. Standardisierung des venösen Thrombosemodells.....  | 30        |
| 2. Einfluss prokoagulatorischer tumoröser Mikropartikel auf die Stenose-<br>induzierte TVT .....     | 30        |
| 3. Beurteilung der Dynamik der Mikropartikel-induzierten venösen Thrombose<br>im Stenosemodell ..... | 30        |
| <b>IV. MATERIAL UND METHODEN .....</b>   | <b>32</b> |

|   |    |
|---|----|
| 1. Versuchstiere .....  | 32 |
| 1.1 Wildtypstamm C57Bl/6J .....                               | 32 |
| 1.2 Genetisch manipulierte Stämme .....                       | 32 |
| 1.3 Tierzucht .....   | 33 |
| 1.4 Tierhaltung .....   | 34 |
| 1.4.1 Tierhaltung allgemein .....                             | 34 |
| 1.4.2 Tierhaltung im 48 h Versuch .....                       | 35 |
| 2. Mikropartikel .....  | 36 |
| 2.1 Zellulärer Ursprung .....                                 | 36 |
| 2.1.1 Blut-Mikropartikel .....                                | 36 |
| 2.1.2 Tumoröse Mikropartikel .....                            | 36 |
| 2.1.2.1 FG-Mikropartikel .....                                | 36 |
| 2.1.2.2 L3.6pl-Mikropartikel .....                            | 37 |
| 2.2 Isolierung .....  | 37 |
| 2.2.1 Isolationsprotokoll Blut-Mikropartikel .....            | 37 |
| 2.2.2 Isolationsprotokoll tumoröser Mikropartikel .....       | 38 |
| 2.3 Markieren von Mikropartikeln .....                        | 38 |
| 2.3.1 DCF .....   | 38 |
| 2.3.2 anti-TF Antikörper .....                                | 39 |
| 2.3.3 anti-TF-Isotyp .....                                    | 40 |
| 2.4 Mikropartikelinjektion .....                              | 40 |
| 3. Operationsverfahren .....                                  | 41 |
| 3.1 Narkose .....   | 41 |
| 3.1.1 Narkotisierung .....                                    | 41 |
| 3.1.2 Antagonisierung der Narkose .....                       | 42 |
| 3.2 Vorbereitung des Operationsfeldes in der Linea alba ..... | 43 |
| 3.3 Jugulariskatheter .....                                   | 44 |
| 3.4 Venöse Stenose .....                                      | 46 |
| 3.4.1 Ligatur der Vena cava caudalis .....                    | 46 |
| 3.4.2 Sham-Operation .....                                    | 48 |
| 3.5 Entnahme der Vena cava caudalis .....                     | 48 |
| 3.5.1 Entnahmetechnik .....                                   | 49 |
| 3.5.2 Gewichtsbestimmung .....                                | 50 |
| 3.6 Kardiale Blutentnahme .....                               | 50 |

|  |           |
|--|-----------|
| Inhaltsverzeichnis                                       | IV        |
| 4. Antikörper- / Inhibitoranwendung                      | 51        |
| 4.1 Injektionsverfahren                                  | 51        |
| 4.2 Zelldepletion  | 51        |
| 4.2.1 Depletion der Thrombozyten                         | 51        |
| 4.2.2 Depletion der Neutrophilen                         | 52        |
| 4.3 PCK ((H-D-Pro-Phe-Arg-chloromethylketone)            | 52        |
| 5. Bildgebende Verfahren                                 | 53        |
| 5.1 Intravitalmikroskopie                                | 53        |
| 5.1.1 Prinzip des Epifluoreszenzmikroskops               | 53        |
| 5.1.2 Verwendeter Fluoreszenzfarbstoff Acridin-Orange    | 55        |
| 5.1.3 Durchführung der Intravitalmikroskopie             | 55        |
| 5.1.4 Auswertung - Flussgeschwindigkeitsbestimmung       | 56        |
| 5.2 Computertomographie                                  | 57        |
| 5.2.1 Prinzip der Computertomographie                    | 57        |
| 5.2.2 Durchführung der Computertomographie               | 57        |
| 5.3 Sonographie  | 58        |
| 5.3.1 Prinzip der Sonographie                            | 58        |
| 5.3.2 Ablauf der sonographischen Untersuchungen          | 59        |
| 5.3.3 Auswertung   | 59        |
| 6. Immunhistologie                                       | 60        |
| 6.1 Anfertigen histologischer Schnitte - Kryotom         | 60        |
| 6.2 Färbung  | 60        |
| 6.2.1 Allgemeines Färbeprotokoll                         | 61        |
| 6.2.2 Zellspezifische Färbungen                          | 62        |
| 7. Dokumentation   | 63        |
| 8. Versuchsplanung                                       | 64        |
| 8.1 Tierzahl   | 64        |
| 8.2 Versuchsgruppen                                      | 65        |
| 8.3 Bildgebende Maßnahmen                                | 67        |
| 9. Statistische Auswertung                               | 68        |
| <b>V. ERGEBNISSE</b>                                     | <b>70</b> |
| 1. Standardisierung der venösen Stenose in Wildtyptieren | 70        |

|  |            |
|--|------------|
| Inhaltsverzeichnis   | V          |
| 1.1 Bestimmung der Flussgeschwindigkeit.....   | 70         |
| 1.2 Leergewichtsbestimmung .....   | 71         |
| 1.3 Thrombusinzidenz.....  | 71         |
| 2. Mikropartikel induzierte venöse Thrombose in Wildtyptieren .....  | 72         |
| 3. Mikropartikel getriggerte venöse Stenose in genetisch manipulierten Linien  | 78         |
| 3.1 P-Selektin knockout .....  | 78         |
| 3.2 GPIIb $\alpha$ knockout .....  | 81         |
| 3.3 TF <sup>fl/fl</sup> LysM Cre <sup>+</sup> .....  | 82         |
| 4. Mikropartikel getriggerte venöse Thrombose unter Einsatz spezifischer<br>Antikörper und Inhibitoren .....         | 83         |
| 4.1 Thrombozytendepletion .....  | 83         |
| 4.2 Neutrophilendepletion .....  | 84         |
| 4.3 Inhibition des FXII .....  | 86         |
| 4.4 Blockade des mikropartikulären TF .....  | 87         |
| 5. Computertomographie .....   | 88         |
| 6. Ultraschalluntersuchungen .....   | 89         |
| 6.1 Übersicht zur Entstehungsdynamik von L3.6pl-assoziierten Thromben ..   | 89         |
| 6.2 Blut-Mikropartikel-assoziierte Thrombogenese.....  | 93         |
| 6.3 Dynamik der Mikropartikel-assoziierten Thrombogenese .....   | 93         |
| <b>VI. DISKUSSION .....</b>  | <b>95</b>  |
| 1. Wahl der Mauslinien .....   | 95         |
| 2. Das Stenosemodell mit partieller Flussreduktion als Tiermodell der<br>spontanen venösen Thrombose .....           | 95         |
| 3. Thromboseinduktion als spezifischer Effekt von Tumormikropartikeln.....   | 97         |
| 4. Dynamik der Thrombogenese .....   | 100        |
| 5. Unabhängigkeit der Mikropartikel-getriggerten venösen Thrombose von<br>leuko- und thrombozytären Einflüssen ..... | 101        |
| 6. Induktion der venösen Thrombose durch TF aus Tumor- Mikropartikeln ....   | 104        |
| <b>VII. ZUSAMMENFASSUNG .....</b>  | <b>107</b> |
| <b>VIII. SUMMARY .....</b>   | <b>108</b> |

|                                       |            |
|---------------------------------------|------------|
| <b>IX. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....</b> | <b>109</b> |
| <b>X. ABBILDUNGSVERZEICHNIS .....</b> | <b>111</b> |
| <b>XI. TABELLENVERZEICHNIS .....</b>  | <b>113</b> |
| <b>XII. LITERATURVERZEICHNIS.....</b> | <b>114</b> |
| <b>XIII. ANHANG.....</b>              | <b>126</b> |
| 1. Danksagung.....                    | 126        |

## I. EINLEITUNG

Bereits im Jahr 1865 beschrieb Armand Trousseau die Assoziation von tumorösen Erkrankungen und erhöhter Gerinnungsneigung<sup>1</sup>.

Noch heute herrscht Uneinigkeit über die genauen Mechanismen, welche der gesteigerten Gerinnungsneigung bei Tumorpatienten zu Grunde liegen. Doch das Augenmerk richtet sich zunehmend auf tumoröse Mikropartikel, die von Tumorzellen abgeschnürt und in die Blutbahn entlassen werden. Diese Mikropartikel stehen unter Verdacht, der entscheidende prokoagulatorische Faktor von Tumoren zu sein und zu einer systemischen Aktivierung der Gerinnungskaskade zu führen.

Obwohl vielfach gezeigt wurde, dass Thrombosen wesentlich zur Morbidität und Mortalität beitragen, ist die Pathophysiologie weitgehend unverstanden. In Ermangelung eines potenten Versuchstiermodells war es bisher kaum möglich die komplexen Prozesse der tumorassoziierten Gerinnungsaktivierung in vivo zu analysieren.

Fakt ist jedoch, dass Tumorpatienten verstärkt unter der Ausbildung venöser Thromben leiden. Um neue Therapieoptionen für die Tumor-assoziierte Thrombose zu entwickeln, ist es jedoch von zentraler Bedeutung, die pathophysiologischen Vorgänge besser zu verstehen. Nur dann können alternative Behandlungsstrategien entworfen werden, um das Risiko tumorassoziiierter venöser Thrombosen zu minimieren bzw. die Nebenwirkungen der tiefen Venenthrombose zu reduzieren. Den Tumorpatienten könnte durch eine gezielte und verträglichere Begleittherapie ein Stück Lebensqualität zurückgegeben werden.

## II. LITERATURÜBERSICHT

### **1. VENÖSE THROMBOSE**

#### **1.1 Definition**

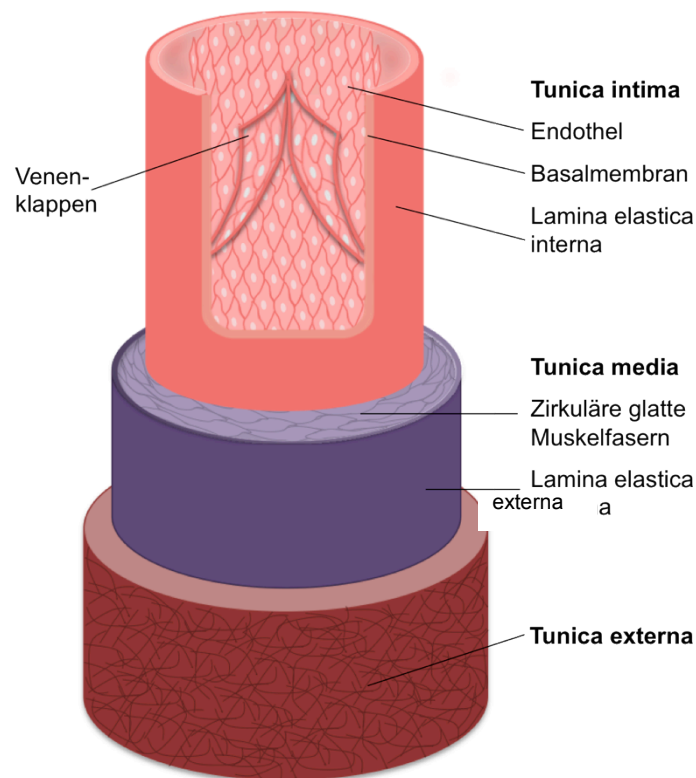
Die Begriffe tiefe venöse Thrombose (TVT) sowie Pulmonalembolie (PE) werden unter dem Terminus venöse Thromboembolie (VTE) zusammengefasst.

Die venöse Thrombose stellt die pathologische Bildung eines lokalisierten Blutkoagels im venösen Schenkel des Blutkreislaufs dar. Als Komplikation mit schwerwiegenden, oft tödlichen Folgen, kann es zu einer pulmonären Embolie kommen, wenn der bzw. ein Teil des gebildeten Thrombus mit dem Blutfluss abgeschwemmt wird und im Gefäßbaum der Lunge relokalisiert.

#### **1.2 Bau venöser Gefäße**

Venen bilden das Niederdrucksystem des Kreislaufs, dem im Wesentlichen zwei wichtige Funktionen zukommt: Zum einen speichern Venen als Kapazitätsgefäße etwa 70% des Blutvolumens, zum anderen wird desoxygeniertes Blut im großen Kreislauf von der Peripherie zurück zum Herzen befördert<sup>2</sup>.

Grundsätzlich weisen venöse wie auch arterielle Gefäße einen dreischichtigen Bau auf: Der luminalen Tunica intima folgt die Tunica media, während die Tunica externa das Gefäß äußerlich umschließt<sup>3</sup>.



**Abbildung 1:** Wandschichtung einer Vene.

Die luminale Auskleidung der Gefäße, die Tunica intima, besteht aus Endothelzellen, die der Basalmembran aufsitzen. Im Unterschied zu arteriellen Gefäßen verfügen mittlere und größere Venen über zweiteilige Venenklappen. Diese Endothelduplikaturen mit eingelagerten, verstärkenden Kollagenfasern verhindern ein Versacken des Blutes in der Peripherie. Klappen fehlen in der Vena cava, der Vena porta sowie den Venen von Niere, Gehirn und Leber<sup>3</sup>.

Hauptcharakteristika der Tunica media sind zirkulär angeordnete, glatte Muskelfasern, zwischen denen Kollagenfasern und elastische Netze eingewoben sind. Im Vergleich zum arteriellen Gefäßbaum, dem Hochdrucksystem des Kreislaufs, der das Blut aktiv in die Peripherie befördert, ist der Muskelfasergehalt bei Venen deutlich reduziert. Da die Eigenkontraktilität der Venen zu gering ist, ist ein aktiver Rücktransport des Blutes zum Herzen nicht möglich. Trotzdem garantiert das Zusammenspiel von Muskelpumpe, Ventilmechanismus der Venenklappen und Atmungspumpe unter physiologischen Bedingungen den Rücktransport zum Herzen und die rhythmische Füllung des rechten Ventrikels<sup>2,3</sup>.

Die Tunica adventitia bzw. externa besteht vorwiegend aus scherengitterartig



verflochtenen kollagenen Faserbündeln sowie netzartig verzweigten glatten Muskelfasern und dient dem Einbau und der Verankerung des Gefäßes in die Umgebung<sup>3</sup>.

### **1.3 Entstehung eines venösen Thrombus**

Bereits im Jahre 1856 beschrieb Virchow drei mögliche Ursachen für die Bildung eines venösen Thrombus, die heute als Virchow'sche Triade bekannt sind. Neben Veränderungen der physiologischen Blutzusammensetzung (Hyperkoagulabilität) sind Alteration der Gefäßwand (Endothelschaden) und Änderung der Hämodynamik, allem voran Reduktion der Strömungsgeschwindigkeit, die Trigger für TVT<sup>4,5</sup>.

#### **1.3.1 Hyperkoagulabilität**

Zustände erhöhter intravasaler Gerinnbarkeit sind vorwiegend auf genetisch bedingte thrombophile Störungen zurückzuführen. Auf der einen Seite stehen Defekte, die mit Funktionsverlust antikoagulatorischer Mechanismen einhergehen. Hierzu zählen z.B. Antithrombin<sup>6</sup>- und Protein C- Defizienz<sup>7</sup>. Demgegenüber stehen Erkrankungen bedingt durch vermehrte Expression oder verminderte Inhibition prokoagulatorischer Mechanismen, wie beispielsweise Faktor V Leiden<sup>8</sup> oder Prothrombin 20210A<sup>9</sup>.

#### **1.3.2 Endothelschaden**

Endothelläsionen sind vorwiegend auf traumatische Ursachen zurück zu führen oder entstehen im Zuge chirurgischer Eingriffe. Geht die Integrität des Endothels verloren können Blutzellen über ihre Adhäsionsrezeptoren mit ihren Liganden der subendothelialen Matrix interagieren. Die Aktivierung der Koagulationskaskade erfolgt in diesem Fall vor allem durch den Kontakt des Blutes mit dem exponierten Tissue factor (TF) der geschädigten Gefäßwand. Das Thromboserisiko steigt rapide an. Im Gegensatz zur arteriellen Thrombose ist die Integrität des Endothels im Falle der venösen Thrombose jedoch zumeist erhal-

ten<sup>10</sup>.

Koellnberger konnte am Mausmodell zeigen, dass spontane venöse Thromben auch ohne Läsion der Gefäßwand, allein durch Reduktion der Flussgeschwindigkeit, in der Vena cava caudalis entstehen<sup>11</sup>.

### **1.3.3 Änderung der Hämodynamik**

Spontane venöse Thromben entwickeln sich häufig im Zusammenhang mit reduzierter Blutströmungsgeschwindigkeit / Stase. Studien zeigen, dass längere Immobilisierung, z.B. wegen längerer Bettruhe<sup>12</sup>, Ruhigstellung durch Gips / Verband<sup>13</sup>, aber auch Langstreckenflüge<sup>14</sup> das Risiko an TVT zu erkranken erhöhen. Entsprechend leiden Patienten mit Hemiparesen nach Schlaganfall deutlich häufiger unter Thrombusbildung in der gelähmten Seite als in der gesunden Seite<sup>15</sup>.

Typischerweise bilden sich venöse Thromben beim Menschen in den tief liegenden Venen der unteren Gliedmaßen<sup>16</sup>. Als Ausgangspunkt der Thrombusbildung gilt der Sinus um die Venenklappen<sup>4,10,16,17</sup>, denn im sinuidalen Raum kann es zu Stase und damit verbunden zu Hypoxie und Akkumulation prothrombotischer Substanzen, wie z.B. TF-positiven (TF<sup>+</sup>) Mikropartikeln kommen, wodurch ein prokoagulatorisches Milieu entsteht. Es wurde bereits gezeigt, dass Endothelzellen im Zuge von Hypoxie aktiviert werden, Weibel Palade Körperchen (WPB) exozytieren und darin gespeichertes P-Selektin präsentieren<sup>18,19,20</sup>. Folge ist die Akkumulation von Leukozyten, aber auch TF<sup>+</sup> Mikropartikeln, die über ihren Membranrezeptor PSGL-1 (P-Selectin Glycoprotein Ligand-1) an das endotheliale P-Selektin binden<sup>21 22</sup>. Außerdem exprimieren Monozyten unter hypoxischen Bedingungen vermehrt TF<sup>18</sup> und tragen somit zur Vergrößerung des lokalen TF-Pools bei. Desweiteren setzen WPB von Willebrand Faktor (vWF) frei, der für die Flussreduktion-induzierte Thrombogenese eine wichtige Rolle spielt<sup>23</sup>.

Als geeignetes in vivo Modell zur weiteren Erforschung der molekularen Mechanismen der venösen Thrombose hat sich das venöse Stenosemodell etabliert, welches alleine die Flussreduktion als Trigger für die Thrombogenese

nutzt<sup>24</sup>. Dieses Modell liegt auch dieser Arbeit zugrunde.

#### **1.4 Venöse Thrombosemodelle bei Labornagern**

Die steigende Inzidenz venöser Thrombosefälle bei Menschen lässt die Erforschung der Ursachen und molekularen Mechanismen immer mehr in den Mittelpunkt des Interesses rücken. Da es sich bei der Phlebothrombogenese jedoch um einen hoch diffizilen Vorgang handelt, bei dem verschiedenste Systeme des Körpers ineinandergreifen, ist es unabdingbar, verlässliche in vivo Modelle zu etablieren, die es erlauben, den Prozess der Thromboseinduktion und -progression im physiologischen Milieu zu studieren.

Mäuse bieten neben den zahlreichen Vorteilen wie einfachem Handling, schneller Reproduktionszeit, unkomplizierter Haltung etc., die Möglichkeit, an spezifischen Knockout-Stämmen den Einfluss einzelner Proteine / Moleküle auf die Phlebothrombogenese zu evaluieren.

Da in der vorliegenden Arbeit venöse Thrombosen an der Vena cava caudalis untersucht werden, sollen im Folgenden alternative Methoden zur makrovaskulären Thrombogenese vorgestellt werden.

##### **1.4.1 Eisenchlorid-Modell**

Ursprünglich entwickelt, um arterielle Thrombosen zu induzieren<sup>25</sup>, wird dieses Modell, übertragen auf das venöse System, auch zur Induktion mikro- und makrovaskulärer venöser Thrombosen eingesetzt.

Auf dem freigelegten Gefäß wird ein mit 3,5 %iger FeCl<sub>3</sub>-Lösung getränktes Stück Filterpapier platziert und nach 2-3 min wieder entfernt. Es entsteht ein transmuraler Gefäßwandschaden, in dessen Folge sich innerhalb von Minuten ein okklusiver Thrombus bildet.

Dieses Modell eignet sich vor allem dazu die Okklusionszeit zu beurteilen, ist jedoch im Hinblick auf den thrombogenen Trigger nur mit einem kleinen Bruchteil klinischer TVT-Fälle vergleichbar<sup>26</sup>. Es beruht auf einer Endothelverletzung

und nicht, wie der Großteil klinischer Fälle, auf einer Flussreduktion ohne Gefäßwandschaden.

#### **1.4.2 Venöse Stase**

Venöse Stase im Sinne einer 100 %igen Flussreduktion durch vollständige Ligatur des Gefäßes, kann ebenfalls eine venöse Thrombose hervorrufen<sup>26-28</sup>.

Im Gegensatz zur venösen Stenose (Abs. 1.4.3) wird das Lumen der Vena cava, ebenso wie Zuflüsse, durch einzelne Ligaturen vollständig verschlossen, woraus eine vollständige Stase resultiert<sup>26</sup>.

Zhou et al. haben die Hypothese erstellt, dass die Stase zur Aktivierung von Endothelzellen und Akkumulation von zellulärem TF führt, was die Thrombogenese triggern soll<sup>21</sup>.

Vorteilhaft ist, dass dieses Modell reproduzierbar zur Thrombusformation führt und somit die Möglichkeit eröffnet, Interaktionen von Endothel und Zellen des sich formierenden Thrombus zu untersuchen. Allerdings ist es wenig geeignet Vergleiche zur humanen Phlebothrombose zu ziehen, da der Blutfluss völlig unterbunden wird<sup>26</sup>, was nur bei einer äußerst geringen Anzahl klinisch manifester Thromboseerkrankungen der Fall ist.

#### **1.4.3 Venöse Stenose**

Ziel dieses Modells ist die Induktion einer venösen Stenose mit 70-80 %iger Reduktion des physiologischen, aber weiterhin bestehendem Restfluss. Unter Einsatz eines Platzhalters wird die Vena cava caudalis kaudal der Einmündung der Vena renalis sinistra ligiert. Wird der Platzhalter entfernt erlaubt das verkleinerte Restlumen Blutfluss durch die Engstelle.

Großer Vorteil dieses Modells ist die Tatsache, dass die Thrombogenese und entsprechend gebildete Thromben der klinischen Präsentation humaner TVT im zeitlichen Verlauf und histologischen Aufbau ähneln, sodass frühe zelluläre Mechanismen, sowie der Verlauf der Thrombusprogression vergleichend studiert werden können<sup>24</sup>.

#### **1.4.4 Elektrolytische Gefäßverletzung**

Ein mit Silber ummantelter Kupferdraht der Stärke einer 30G Kanüle, welcher mit einer 25G Kanüle verbunden ist, wird zum einen subkutan (Kathode), zum anderen intravenös (i.v.) in die hintere Hohlvene (Anode) inseriert. Für 15 min wird ein Stromfluss von 25  $\mu$ Amp angelegt, um die Bildung freier Radikale anzuregen. Diese Radikale schädigen und aktivieren das Endothel<sup>29</sup>.

Diese Methode kann als Alternative zum Stenosemodell genutzt werden, da der Blutfluss erhalten und das Endothel intakt bleibt. Nur an der Einstichstelle wird das Endothel denudiert, was die Ergebnisse verfälschen kann<sup>26</sup>.

### **1.5 Aufbau venöser Thromben**

#### **1.5.1 Aufbau humaner venöser Thromben**

Die makroskopische und mikroskopische Untersuchung humaner venöser Thromben lässt ein wiederkehrendes Muster der Verteilung zellulärer Bestandteile erkennen.

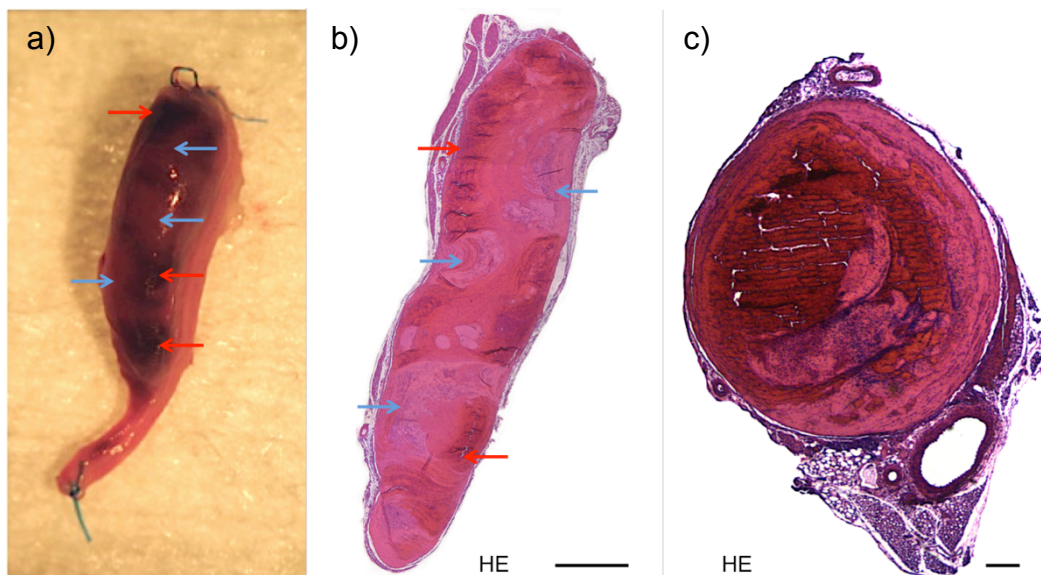
Simon Sevitt beschrieb den Aufbau venöser Thromben schon im Jahr 1974 eingehend. Aus seinen Studien wurde ersichtlich, dass die Zellverteilung innerhalb des Thrombus variiert. Es gilt dabei zwischen den makroskopisch unterscheidbaren roten und weißen Regionen zu differenzieren<sup>10</sup>.

Die roten Areale entsprechen den Stellen der frühen Zelladhäsion und Zellinvasion und finden sich vorwiegend distal, aber auch lateral in der Thrombusmasse lokalisiert. Histologisch entspricht das rote Erscheinungsbild einer dicht gepackten Erythrozytenmasse, die von Fibrinsträngen und Leukozyten durchzogen wird. Im Gegensatz dazu dehnen sich die weißen Areale proximolateral aus. Sie sind als Region der Thrombusprogression zu verstehen. Charakteristisch für den weißen Thrombus ist eine Vielzahl an Thrombozyten, umgeben von feinen Fibrinfäden. Im Querschnitt fällt eine laminare Schichtung des Thrombus auf.

### 1.5.2 Aufbau Stenose-induzierter muriner venöser Thromben

Die Struktur und Zusammensetzung venöser Thromben, die mittels des venösen Stenosemodells generiert wurden, erforschten v. Brühl und Stark. Diese Thromben wiesen ebenso wie spontane humane Thromben einen geschichteten Aufbau mit roten und weißen Arealen auf. Dabei liegt der rote Thrombusanteil immer unmittelbar benachbart zur Ligaturstelle. Auch die in humanen Thromben charakteristische laminare Schichtung von kernhaltigen und kernlosen Strukturen ist im Mausmodell darstellbar. Immunhistologische Färbungen offenbaren, dass es sich bei den kernhaltigen Zellen um Leukozyten, im Speziellen um Neutrophile handelt, die den Großteil der Zellen stellen. Daneben finden sich Monozyten, wohingegen Lymphozyten kaum nachweisbar sind<sup>24</sup>.

Mit Hilfe des murinen venösen Stenosemodells lässt sich ein Milieu schaffen, welches dem der venösen Sinus ähnelt. Auf diese Weise wird die Bildung von Thromben angeregt, die im Hinblick auf Trigger (Flussreduktion), Kinetik (protrahierter Verlauf von 48 h) sowie makro- und mikroskopischer Struktur der Mehrzahl spontan entstehender humaner Thromben ähneln.



**Abbildung 2:** Makro- und mikroskopische Ansicht eines murinen Thrombus 48 h nach Ligatur, mit freundlicher Genehmigung von Prof. Dr. Massberg und Dr. Chandraratne, LMU München.

**a)** Deutlich geschichteter venöser Thrombus nach Entnahme; rote Pfeile = roter Bereich, blaue Pfeile = weißes Thrombusareal; **b)** Histologischer Längsschnitt und **c)** Querschnitt eines venösen Thrombus mit klarer Schichtung.

### **1.6 Klinische Relevanz venöser Thrombosen**

Zu den häufigsten vaskulären Dysfunktionen zählen, neben Myokardinfarkt und Schlaganfall (Apoplexia cerebri), das Auftreten venöser Thrombosen.

In den Industrienationen wird die Phlebothrombose schon auf Grund der demographischen Entwicklung zu einem zunehmenden Problem, denn es ist eine starke Altersabhängigkeit erkennbar. Während die Inzidenz innerhalb der Bevölkerung bis 40 Jahre im Durchschnitt bei 1:1000 liegt, steigt die Inzidenz ab einem Alter von 45 Jahren dramatisch an und bewegt sich bei den über 80-Jährigen im Bereich von 5-6:1000<sup>30,31</sup>.

Unterschiedlichste Risikofaktoren beeinflussen die Entstehung von TVT. Hierzu zählen beispielsweise Adipositas, die das Risiko um das 2-3fache steigert<sup>32,33</sup>. Auch längere Phasen der Immobilisierung, welche mit venöser Stase verbunden sind, wie Bettruhe, Ruhigstellung durch Gips oder Paralysen<sup>34,35</sup>, aber auch längere Reisen mit Bus, Bahn oder Flugzeug<sup>14</sup> erhöhen das Risiko an TVT zu erkranken.

Desweiteren gehen verschiedene Krankheitsbilder mit gesteigerter Thrombose-rate einher, wobei an erster Stelle Tumoren (Abs. 6.1) zu nennen sind.

Häufig verläuft die Bildung venöser Thromben klinisch inapparent, dennoch können die Folgen fatal sein. TVT und allem voran die in Folge von Abschwemmung des bzw. eines Teils des Thrombus entstehenden Lungenembolien bedingen eine Mortalitätsrate von ca. 6 % innerhalb der betroffenen Patientenpopulation<sup>36</sup>. Viele der Überlebenden (5-7 %) leiden unter rezidivierenden thrombotischen Ereignissen<sup>36-38</sup> oder haben mit den Erscheinungen des sogenannten postthrombotischen Syndroms zu kämpfen. Das heißt, etwa 20-50 % der TVT-Patienten leiden unter Schwellungen, Schmerzen und Hautproblemen bis hin zu thrombotischen Ulzera an der betroffenen Gliedmaße<sup>38,39</sup>.

Die Erforschung der auslösenden Mechanismen der TVT sowie gezielter Therapiemöglichkeiten gewinnt mehr und mehr an Bedeutung, um dem wachsenden Problem der venösen Thromboembolisierung Herr werden zu können.

## **2. THROMBOZYTEN**

### **2.1 Definition**

Thrombozyten sind kernlose, discoidale Zellen von 2-4 µm Durchmesser. Ihre Vorläuferzellen, die Megakaryozyten, finden sich im Knochenmark, wo sie Thrombozyten abschnüren und in die Blutbahn entlassen. Diese kleinsten korpuskulären Strukturen im Blut spielen eine eminent wichtige Rolle für die Hämostase, da sie an verletztem oder dysfunktionalem Endothel adhärieren und aggregieren und so den Defekt primär versiegeln. Zudem regen sie die lokale Fibrinbildung an, sodass ein stabiler Thrombus entsteht<sup>3,40</sup>.

### **2.2 Relevante Rezeptoren**

#### **2.2.1 GPIb-IX-V**

Dieses Adhäsionsmolekül, aus der Gruppe der leucinreichen Glykoproteine, besteht aus vier Untereinheiten: GPIb<sub>α</sub>, GPIb<sub>β</sub>, GPV und GPIX. Vor allem GPIb<sub>α</sub> spielt im Rahmen der Gerinnung eine bedeutende Rolle, denn es bindet vWF<sup>40-42</sup>, aber auch Mac 1<sup>43</sup>, P-Selektin<sup>44</sup>, α-Thrombin und Kininogen<sup>45</sup>. Über die Interaktion mit vWF, einem Glykoprotein, welches in der subendothelialen Matrix lokalisiert ist oder aus den α-Granula von aktivierten Plättchen bzw. aus den WPB aktivierter Endothelzellen entlassen wird<sup>46</sup>, wird die transiente Adhäsion von Thrombozyten auch in Bereichen hoher Scherkräfte ermöglicht. In Folge der Bindung von GPIb-IX-V an vWF werden intrazelluläre Prozesse in Gang gesetzt, Plättchen werden aktiviert, es kommt zur Formänderung, Spreading und Sekretion. Folglich werden weitere Thrombozyten rekrutiert, die aggregieren.

Wie von Chandraratne beschrieben, hatte das Fehlen des funktionalen GPIb Rezeptors bei IL4-R/Iba-Mäusen, die der venösen Stenoseoperation unterzogen wurde, massive Auswirkungen auf die Thrombogenese. Intravitalmikroskopische Aufnahmen belegen, dass 6 h nach Induktion der Flussreduktion adhärente Thrombozyten nur diffus verteilt angetroffen und keine Aggregatbildung beobachtet werden konnte. Ebenso war die Leukozytenadhäsion sowie die



Thrombozyten-Leukozyten-Interaktion signifikant reduziert. In Folge dessen war die Thrombogenese signifikant eingeschränkt. Zusätzlich war auch die Bildung der sog. NETs (Neutrophil extracellular trap) reduziert, welche ebenfalls eine wichtige Rolle für die Thrombusbildung spielen<sup>47</sup>.

### **2.2.2 GPIIb-IIIa ( $\alpha_{IIb} \beta_3$ )**

Zur Familie der Integrine, bei denen es sich um transmembranöse Adhäsionsrezeptoren handelt, die sich jeweils aus einer  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheit zusammensetzen, welche eine funktionelle Einheit bilden und zwischen Strukturen des Cytoskeletts und der EZM vermitteln, zählt auch der Fibrinogenrezeptor GPIIb-IIIa. Er findet sich auf der Plasmamembran von Thrombozyten, wo etwa 70 % konstitutiv exprimiert werden, allerdings in einem geringaffinen Funktionsstadium vorkommen. Etwa 30 % sind in den  $\alpha$ -Granula der Plättchen lokalisiert und werden erst bei Aktivierung freigesetzt.

Physiologischerweise kann inaktives GPIIb-IIIa lösliches Fibrinogen nicht binden. Erst nach Aktivierung der Thrombozyten kommt es zur Konformationsänderung des Rezeptors in eine hochaffine Form, die mit Fibrinogen interagieren kann<sup>40</sup>.

### **2.2.3 P-Selektin**

Neben E-Selektin, welches die Granulozytenadhäsion an aktiviertem Endothel vermittelt und L-Selektin, das von Leukozyten exprimiert wird und ebenfalls die Interaktion mit Endothelzellen steuert, zählt P-Selektin zu den heute bekannten Selektinen.

Sowohl Plättchen als auch Leukozyten rollen auf aktiviertem Endothel, bevor sie an verletztem oder dysfunktionalem Endothel adhären werden. Gerade in diesem Prozess nimmt P-Selektin eine Schlüsselrolle ein. Leukozyten binden über den Counterrezeptor PSGL-1<sup>48,49-51</sup>. PSGL-1 ist gleichfalls in geringen Mengen auf Plättchen zu finden<sup>52</sup>. Zudem interagieren Thrombozyten über den vWF-Rezeptor GPIb $_{\alpha}$  mit P-Selektin<sup>44</sup>.

Ein positiver Nachweis von P-Selektin gelingt in Thrombozyten, wo es in den  $\alpha$ -Granula gespeichert wird<sup>53</sup> und in endothelialen WPB<sup>54</sup>. P-Selektin wird erst bei Aktivierung dieser beiden Zelltypen auf die Zelloberfläche transloziert<sup>55</sup>.

P-Selektin ist von essentieller Bedeutung für die Leukozytenrekrutierung an das Endothel sowie für die Plättchen-Leukozyten-Interaktion<sup>48</sup>. Schon länger wurde vermutet, dass P-Selektin eine Rolle für die Hämostase bzw. Thrombosebildung spielt. In der Tat zeigen P-Selektin<sup>-/-</sup> Mäuse eine um 40 % verlängerte Blutungszeit<sup>56</sup>.

Koellnberger und Steinhart haben die Rolle von P-Selektin im venösen Thrombosemodell näher definiert und konnten zeigen, dass P-Selektin in der initialen Phase der Thrombusbildung eine herausragende Bedeutung zukommt und dass P-Selektin<sup>-/-</sup> Tiere deutlich weniger und kleinere Thromben entwickeln<sup>11,57</sup>. Dies ist vor allem darauf zurückzuführen, dass die Leukozytenrekrutierung nahezu vollständig inhibiert wird und damit die Thromboseinitiierung verhindert wird.

Ein weiterer Aspekt ist, dass PSGL-1 positive Mikropartikel an P-Selektin binden können und somit die lokale Konzentration an TF massiv zu erhöhen vermögen, was eine Aktivierung der Koagulationskaskade zur Folge haben kann<sup>22</sup>.

### **2.3 Rolle der Thrombozyten für die Entstehung der venösen Thrombose**

Man geht davon aus, dass Thrombozyten vor allem an der arteriellen Thrombose beteiligt sind, die venöse Thrombose aber nur durch Aktivierung der Blutgerinnung induziert wird. Neuere Untersuchungen legen jedoch nahe, dass Thrombozyten auch für die venöse Thrombose von Bedeutung sind<sup>23,24</sup>. Dies konnte kürzlich auch bei Patienten bestätigt werden<sup>58</sup>.

In der Initialphase der Thrombusbildung steigt die Anzahl adhärenter Thrombozyten kontinuierlich an<sup>24,57</sup>. Sie binden über den Rezeptor GPIIb entweder direkt an endothelialen vWF und / oder über P-Selektin an rekrutierte Leukozyten, mit denen sie Aggregate bilden. Plättchendepletierte Mäuse zeigen ebenso wie GPIIb<sup>-/-</sup> Tiere eine signifikant reduzierte Thrombusinzidenz<sup>24</sup> im Stenose-induzierten Thrombosemodell, was auf den Wegfall folgender Faktoren zurück-

zuführen ist:

1. Der Fibrinogenrezeptor GPIIb-IIIa, der bei Aktivierung von Thrombozyten in die hochaffine Konformation überführt wird, kann nun an lösliches Fibrinogen binden. Folge ist die Quervernetzung und Aggregatbildung von Blutplättchen.
2. Aktivierte Thrombozyten degranulieren Proteine wie Phosphodiisomerase (PDI), eine Protease, die als Aktivator von ruhendem TF gilt. Diese gelangen in den extrazellulären Raum und können lokal akkumulierten monozytären TF in die aktive Form konvertieren.
3. Wie bereits belegt werden konnte stimulieren Plättchen die NETosis von Neutrophilen und triggern so, auf indirekte Art und Weise, die Leukozyten-abhängige Fibrinbildung über Aktivierung des intrinsischen Weges der Koagulationskaskade<sup>24,59</sup>.

Die Thrombozyten-Leukozyten-Interaktion scheint additive Effekte auf die Aktivierung und Akkumulation beider Zelltypen zu haben. In diesem sehr komplexen System bedingen sich die Funktionen und Auswirkungen der Leukozyten- und Thrombozytenrekrutierung, sodass eine separate Betrachtung der zellulären Mechanismen nur eingeschränkt möglich ist.

### **3. LEUKOZYTEN**

#### **3.1 Definition**

Leukozyten sind kernhaltige Blutzellen, die ihren Ursprung im Knochenmark haben. Myeloische Stammzellen bilden die Vorläufer von Monozyten, neutrophilen, basophilen und eosinophilen Granulozyten. Dahingegen stammen B- und T-Lymphozyten von lymphoiden Stammzellen ab. Die Subpopulationen lassen sich entsprechend ihres Färbeverhaltens unterscheiden. Nur etwa 5 % der Gesamtleukozyten zirkuliert im Blut. Der Großteil der Leukozyten ist in den Organen verteilt<sup>2</sup>.

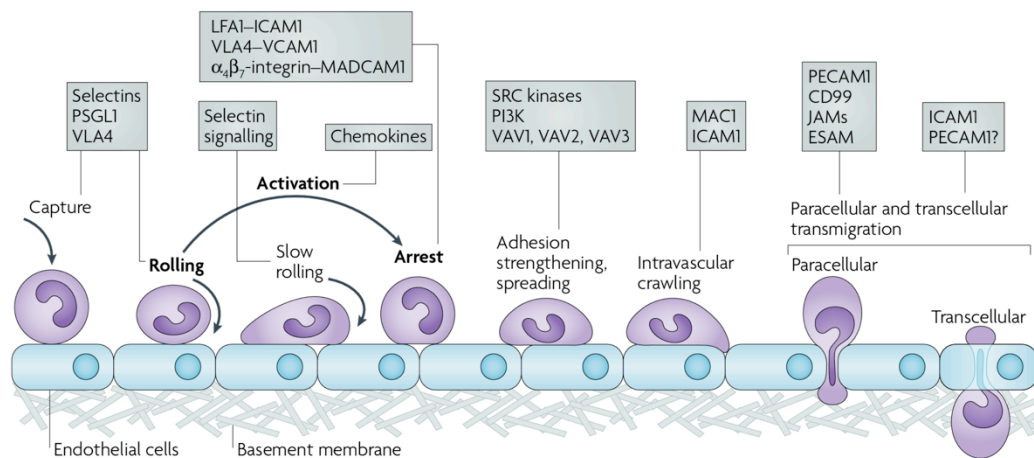
Übersteigt der prozentuale Anteil der Granulozyten im Differentialblutbild 50 % der Gesamtleukozyten spricht man von einem granulozytären Blutbild. Dies ist

beispielsweise beim Menschen der Fall. Mäuse hingegen weisen ein lymphozytäres Blutbild auf.

Schon lange ist bekannt, dass Leukozyten eine tragende Rolle in Zuge der angeborenen und erworbenen Immunabwehr spielen. Desweiteren ist ihre Bedeutung für die Entstehung der venösen Thrombose zu beachten, was erst in jüngerer Zeit gezeigt werden konnte.

### 3.2 Adhäsionskaskade

Grundvoraussetzung für die Diapedese von Leukozyten ist die Interaktion mit Endothelzellen, die folgende Adhärenz und schließlich die Transmigration. Seit Jahren existiert ein Modell zur Adhäsionskaskade, welches ursprünglich drei Schritte umfasste: 1. Selektin-vermitteltes Rollen, 2. Chemokin-abhängige Aktivierung der Neutrophilen und 3. Integrin-vermittelter Arrest auf dem Endothel<sup>60</sup>.



**Abbildung 3:** Adhäsionskaskade von Leukozyten, mit freundlicher Genehmigung von Macmillan Publishers Ltd: Nature Reviews Immunology<sup>55</sup>, Copyright (2007).

Kontinuierliche Forschung und neue Erkenntnisse erlauben heute ein besseres Verständnis der Zell-Zell-Interaktionen und der beteiligten Rezeptoren. In Folge dessen konnten zusätzliche Schritte der Adhäsionskaskade definiert werden (Abb. 3) Das aktuelle Modell umfasst: 1. loses Binden (Tethering), 2. Rollen, den Zwischenschritt 3. langsames Rollen vor dem 4. Arrest, 5. Festigung der Adhäsion / Spreading, 6. intravaskuläres Kriechen und schließlich 7. trans- bzw.

parazelluläre Transmigration<sup>55</sup>.

Tethering, Rollen und langsames Rollen der Leukozyten auf dem Endothel geschieht Selektin-vermittelt. Von den drei bekannten Selektinen spielt P-Selektin, das von inflammatorischen Endothelzellen, aber auch von aktivierten Thrombozyten exprimiert wird, die Hauptrolle. Leukozyten binden P-Selektin über den Counterrezeptor PSGL-1 (Abs. 2.2.3).

Während des Rollens triggern Chemokine die Aktivierung der leukozytären Integrine wie LFA-1 oder VLA-4, die an ICAM-1 oder VCAM-1 auf der luminalen Membran von Endothelzellen binden. Es kommt zur festen Adhäsion und zum Arrest der Leukozyten und im weiteren Verlauf zum Spreading. Mit langsamen, kriechenden Bewegungen, dem sog. Crawling der Leukozyten, suchen diese das Endothel nach geeigneten Emigrationsstellen im Bereich postkapillärer Venolen ab, bevor sie auf para- oder transzellulärem Weg das Gefäßlumen verlassen. Auch die Transmigration erfordert ein komplexes Zusammenspiel von Integrinen der Leukozyten mit endothelialen Adhäsionsrezeptoren<sup>55</sup>.

### **3.3 Subpopulationen**

In aktuellen Publikationen wird beschrieben, dass neutrophile Granulozyten und Monozyten einen großen Einfluss auf den Entstehungsprozess der venösen Thrombose nach Flussreduktion haben und deshalb werden sie näher betrachtet.

#### **3.3.1 Monozyten**

Nach ihrer Bildung im Knochenmark migrieren Monozyten in die Blutbahn. Mit einem Durchmesser von 12-20 µm sind sie die größten Leukozyten. Ultrastrukturell zeichnen sie sich durch einen hufeisenförmigen, dezentralen Kern aus.

Monozyten verweilen nur kurzzeitig (1-2 Tage) im Blut; bald wandern sie in das Gewebe aus und differenzieren unter Einfluss der spezifischen Milieubedingungen zu Makrophagen. Diese Zellen sind langlebig und können über Jahre hinweg aktiv bleiben<sup>3,61</sup>.

Hauptfunktion der Monozyten bzw. Makrophagen ist die Phagozytose großer Partikel. Sie sind befähigt, Antigene auf ihrer Oberfläche zu präsentieren und spielen somit eine wichtige Rolle für die spezifische Immunantwort<sup>3</sup>.

Für Subpopulationen von Monozyten konnte die Expression von TF belegt werden. Diese ist sowohl auf Zellen in ruhendem Zustand nachweisbar<sup>62</sup>, doch ist die TF-Expression bei stimulierten Monozyten wesentlich erhöht<sup>63,64</sup>. Zudem entlassen stimulierte Monozyten vermehrt TF<sup>+</sup> Mikropartikel in die Blutbahn<sup>65,66</sup>.

### **3.3.2 Neutrophile Granulozyten**

Im lymphozytären Blutbild der Maus stellen neutrophile Granulozyten 20-30 % der Gesamtleukozyten<sup>2</sup>, mit 90 % jedoch das Gros der zirkulierenden Granulozyten<sup>61</sup>.

Neutrophile sind segmentkernige Zellen von 10-20 µm Durchmesser. Ultrastrukturell zeichnen sie sich durch zahlreiche neutrophile Granula aus, welche lysosomale Enzyme enthalten. Neutrophile sind befähigt, chemotaktischen Stimuli folgend, aktiv in inflammatorisches Gewebe auszuwandern<sup>2</sup>. Sie phagozytieren kleinere Partikel, allem voran Infektionserreger, nachdem diese gebunden und erkannt wurden und verdauen diese intrazellulär im Phagolysosom. Zudem sind Neutrophile in der Lage Antigene durch Abgabe des Granulainhalts extrazellulär zu verdauen.

Ob Neutrophile TF exprimieren wird kontrovers diskutiert. Auf der einen Seite existieren Berichte, dass komplement-aktivierte Neutrophile TF<sup>+</sup> sind und TF<sup>+</sup> Mikropartikel abscheiden<sup>67</sup>. Zudem wurde vermutet, dass endothelgebundene Neutrophile in der Initialphase der Thrombusbildung als Hauptlieferant für zirkulierenden TF dienen<sup>68</sup>. Weiterhin sollen Neutrophile in verschiedenen Krankheitsbildern, wie z.B. Sepsis, TF exprimieren<sup>69</sup>.

Anderen Forschergruppen hingegen war es nicht möglich TF-Aktivität oder TF-Protein in Neutrophilen zu detektieren. Andererseits scheint die Interaktion monozytärer Mikropartikel mit Neutrophilen möglich, sodass die den Neutrophilen zugesprochene TF-Aktivität auf gebundene monozytäre Mikropartikel zurück geführt werden könnte<sup>70</sup>.

### **3.4 Rolle der Leukozyten für die Entstehung der venösen Thrombose**

Dass Leukozyten eine Bedeutung für die Entstehung der venösen Thrombose haben wurde schon lange vermutet, da sie in großer Anzahl in murinen wie auch humanen venösen Thromben zu finden sind<sup>10,71,72</sup>.

Dabei blieben die molekularen Mechanismen lange Zeit unbekannt. Koellnberger und Steinhart aus der eigenen Forschungsgruppe konnten grundlegende Mechanismen auf zellulärer und molekularer Ebene definieren und somit das Verständnis über den Zusammenhang zwischen Inflammation und venöser Thrombose fördern<sup>11,57</sup>.

In intravitalmikroskopischen Untersuchungen war es möglich nachzuweisen, dass es innerhalb der ersten 6 h nach Induktion einer venösen Flussverlangsamung durch partielle Ligatur der Vena cava caudalis und somit Induktion einer venösen Stenose zur massiven Rekrutierung myeloider Leukozyten am aktivierten Endothel kommt, sodass nahezu das gesamte Endothel von den Leukozyten bedeckt war<sup>11,57</sup>. Die Auswertung der Aufnahmen im Hinblick auf die Leukozytenadhäsion und –aggregation ergab, dass initial 84,4 % der rekrutierten Gesamtleukozyten Neutrophile sind. 19,2 % entfallen auf Monozyten. Im Vergleich dazu kommt es 48 h post Ligatur zu einer Verschiebung der Zellverteilung: 33,9 % Monozyten, 66,1 % Neutrophile<sup>57</sup>.

Die Entstehung einer Phlebothrombose kann als sterile Inflammation interpretiert werden, einhergehend mit aktiver Leukozytenrekrutierung - initial neutrophile Granulozyten, Monozyten im späteren Verlauf - im Zuge der Thrombusprogression.

#### **3.4.1 Beitrag von Monozyten**

Da Hypoxie nicht nur Endothelzellen zu aktivieren vermag, sondern auch Monozyten<sup>18</sup> ist es wahrscheinlich, dass über diesen Mechanismus die lokale TF-Expression hochreguliert wird. Dies wird initial durch die am Stenose-induzierten aktivierten Endothel rekrutierten Monozyten selbst, zum anderen durch vermehrt abgeschnürte monozytäre Mikropartikel erreicht. Monozyten und Mikropartikel können auf diese Weise die Thrombusentstehung fördern. Die

monozytären Mikropartikel, die wie die Mutterzelle neben TF auch den Membranrezeptor PSGL-1 auf der Oberfläche tragen, können darüber hinaus dazu beitragen, dass aktivierte Thrombozyten vermehrt an Endothelzellen akkumulieren<sup>73</sup>. Monozyten können so die Gerinnung über den extrinsischen Gerinnungsweg anregen.

### **3.4.2 Beitrag von Neutrophilen**

Zwar ist die TF-Konzentration auf Neutrophilen und deren Mikropartikeln sehr gering, doch tragen Neutrophile auf andere Weise zur Thrombogenese bei: Durch das Ausschleudern von prokoagulatorischen und prothrombotischen NETs<sup>24</sup>. Weiterhin wurde in in vitro Perfusionsversuchen von Fuchs et al. gezeigt, dass Thrombozyten an NETs adhärieren, aktiviert werden und aggregieren<sup>74</sup>. Aktivierte Plättchen wiederum entlassen granuläre Proteine, wie z.B. PDI, das als Aktivator von TF auf den Oberflächen der NETs identifiziert werden konnte<sup>75</sup>.

Ein Aspekt des thrombogenen Potentials von Neutrophilen kann also auf die NETs-abhängige Thrombozytenaggregation und die PDI-vermittelte Aktivierung des lokal akkumulierten monozytären TF im Bereich der venösen Stase zurück geführt werden. Die NETs bilden hierbei gleichsam eine Plattform, auf deren Oberflächen die prokoagulatorischen Prozesse stattfinden können.

Ein weiterer prokoagulatorischer Prozess, der durch NETs induziert wird, ist die Autoaktivierung von FXII zu FXIIa. Dies wird durch die negative Ladung des de-kondensierten Chromatins auf der Oberfläche der NETs getriggert. Auf diese Weise wird die intrinsische Koagulationskaskade angeregt, was bereits in vitro und in vivo gezeigt werden konnte<sup>24,76</sup>.

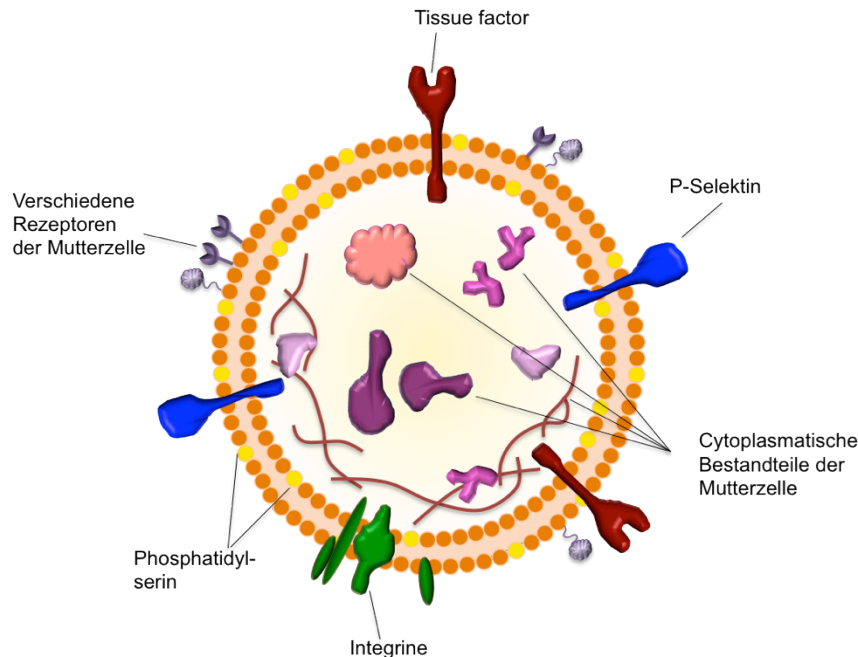
## **4. MIKROPARTIKEL**

### **4.1 Definition**

Mikropartikel sind heterogene, 100-1000 nm kleine Fragmente mit negativ gela-



dener, Phosphatidylserin-reicher Oberfläche, die von apoptotischen oder aktivierten Zellen abgespalten und in die Blutbahn entlassen werden. Da sie von der Ursprungszelle stammende Membranrezeptoren, cytoplasmatische und nukleäre Moleküle tragen, ist es möglich, sie der Mutterzelle aufgrund ihrer charakteristischen Ausstattung mit Oberflächenmolekülen zuzuordnen<sup>77,78</sup>.



**Abbildung 4:** Schematische Darstellung eines Mikropartikels.

## 4.2 Herkunft und Funktion

Im aktivierten oder apoptotischen Zustand spalten verschiedene Zelltypen Mikropartikel ab. Als Hauptquelle gelten Thrombozyten, auf die rund 80 % des gesamten Blut-Mikropartikel-Pools zurückzuführen sind<sup>79</sup>.

Daneben produzieren Monozyten, Neutrophile und Endothelzellen sowie Erythrozyten und glatte Muskelzellen (smooth muscle cells = SMC) der Gefäßwand Mikropartikel und entlassen diese in die Blutbahn<sup>80,81,82</sup>.

Funktionell gesehen kommen den Mikropartikeln vielfältige Aufgaben zu. Sie sind befähigt mit verschiedenen Zielzellen zu interagieren, zu fusionieren oder in selbige aufgenommen zu werden und medieren so die Zell-Zell-Kommunikation<sup>77,78</sup>.

Sie sind aber auch an pathologischen Prozessen beteiligt. So ist bereits seit längerer Zeit bekannt, dass zelluläre Mikropartikel thrombogenes Potential aufweisen. Die genauen molekularen Mechanismen sind bisher allerdings unvollständig erforscht. Die vorliegende Arbeit soll einen Beitrag zum besseren Verständnis der prokoagulatorischen Eigenschaften von Mikropartikeln leisten.

### **4.3 Thrombogene Mikropartikel**

Schon mehrfach wurde ein Zusammenhang zwischen Mikropartikeln und Thrombose vermutet<sup>83,84</sup>. Auf molekularer Ebene wird dem Molekül TF eine herausragende Bedeutung für die Thrombogenese zugeschrieben und mehrere Studien belegen die Existenz von TF<sup>+</sup> Mikropartikeln<sup>85-87</sup>. Diese TF<sup>+</sup> Mikropartikel können im Bereich vaskulärer Läsionen akkumulieren und zur Koagulationsinitiierung beitragen<sup>22,88</sup>. Dabei stellt sich die grundlegende Frage, ob allen Mikropartikeln thrombogenes Potential zugesprochen werden muss oder ob ihre prokoagulatorischen Eigenschaften respektive ihre TF-Expression abhängig von der zellulären Abstammung der Mikropartikel variieren.

#### **4.3.1 Monozytäre Mikropartikel**

Subpopulationen von Monozyten exprimieren auch im ruhenden Zustand TF, jedoch ist die TF-Expression bei stimulierten Monozyten wesentlich erhöht<sup>62,64</sup>. Zudem entlassen stimulierte Monozyten vermehrt TF<sup>+</sup> Mikropartikel in die Blutbahn<sup>63-65</sup>. Monozytäre Mikropartikel tragen neben TF auch den Membranrezeptor PSGL-1 auf der Oberfläche, der die Interaktion mit aktivierten Thrombozyten und Endothelzellen vermittelt<sup>73</sup>.

#### **4.3.2 Thrombozytäre Mikropartikel**

Mehrere Studien deuten darauf hin, dass Plättchen selbst keinen TF exprimieren oder nur in sehr geringen Mengen und deshalb thrombozytäre Mikropartikel keinen Beitrag zum TF<sup>+</sup> Mikropartikelpool leisten<sup>63,89,90</sup>. Wahrscheinlicher ist es, dass monozytäre TF<sup>+</sup> Mikropartikel über PSGL-1 an das P-Selektin aktivierter

Plättchen binden und ein positiver Nachweis möglich wird.

### **4.3.3 Granulozytäre Mikropartikel**

Ob Neutrophile TF exprimieren wird kontrovers diskutiert. Auf der einen Seite existieren Berichte, dass komplement-aktivierte Neutrophile  $TF^+$  sind und  $TF^+$  Mikropartikel abscheiden<sup>67</sup>. Andererseits scheint die Interaktion monozytärer Mikropartikel mit Neutrophilen möglich, sodass - ähnlich den thrombozytären Mikropartikeln - die den Neutrophilen zugesprochene TF-Aktivität auf gebundene monozytäre Mikropartikel zurück geführt werden kann<sup>70</sup>.

### **4.3.4 Endotheliale Mikropartikel**

In Hinblick auf die TF-Expression durch Endothelzellen sind ebenfalls widersprüchliche Studien zu finden. Zwar ist ein positiver Nachweis von TF auf unstimulierten Endothelzellen nicht gelungen, im Zuge bestimmter Krankheiten jedoch auf aktivierten Endothelien durchaus möglich. Von aktivierten Endothelzellen können also auch  $TF^+$  Mikropartikel abstammen<sup>91</sup>.

## **4.4 Bedeutung für die Entstehung der venösen Thrombose**

Gemeinsam mit den TF präsentierenden Zellen, allen voran Monozyten, tragen  $TF^+$  Mikropartikel zu einem erhöhten Blut-TF-Pool bei und spielen eine wichtige Rolle im Hinblick auf die Thrombusinitiierung als auch auf die Thrombusprogression.

### **4.4.1 Thrombusinitiierung**

Im Modell der venösen Stenose entsteht durch die Verlangsamung des Blutflusses eine Veränderung der Scherkräfte sowie eine lokale Hypoxie, was zur Aktivierung von Endothelzellen führt. Diese exprimieren P-Selektin, woran monozytäre Mikropartikel via PSGL-1 binden können<sup>22,54,55,73</sup>. TF akkumuliert im

Bereich des stimulierten Endothels. Desweiteren interagieren Plättchen mit aktivierten Endothelzellen, erfahren ihrerseits eine Aktivierung und schütten unter anderem das Enzym PDI aus. Dieses Enzym konnte als Aktivator von TF identifiziert werden, der eine Konformationsänderung des Moleküls verursacht, was eine Steigerung seiner prokoagulatorischen Eigenschaften zur Folge hat<sup>75</sup>. TF kann nun FVII und FVIIa binden und die Fibrinbildung initiieren.

#### **4.4.2 Thrombusprogression**

Auch das Fortschreiten des Thrombuswachstums kann anteilig den TF<sup>+</sup> Mikropartikeln zugeschrieben werden. Mikropartikel binden und kommunizieren mit den Plättchen, die den Endotheldefekt bereits bedecken<sup>53,55,65,85</sup>. Somit stellen sie eine alternative Quelle für TF dar, welche die Koagulationskaskade restimulieren kann.

### **5. TISSUE FACTOR**

#### **5.1 Definition**

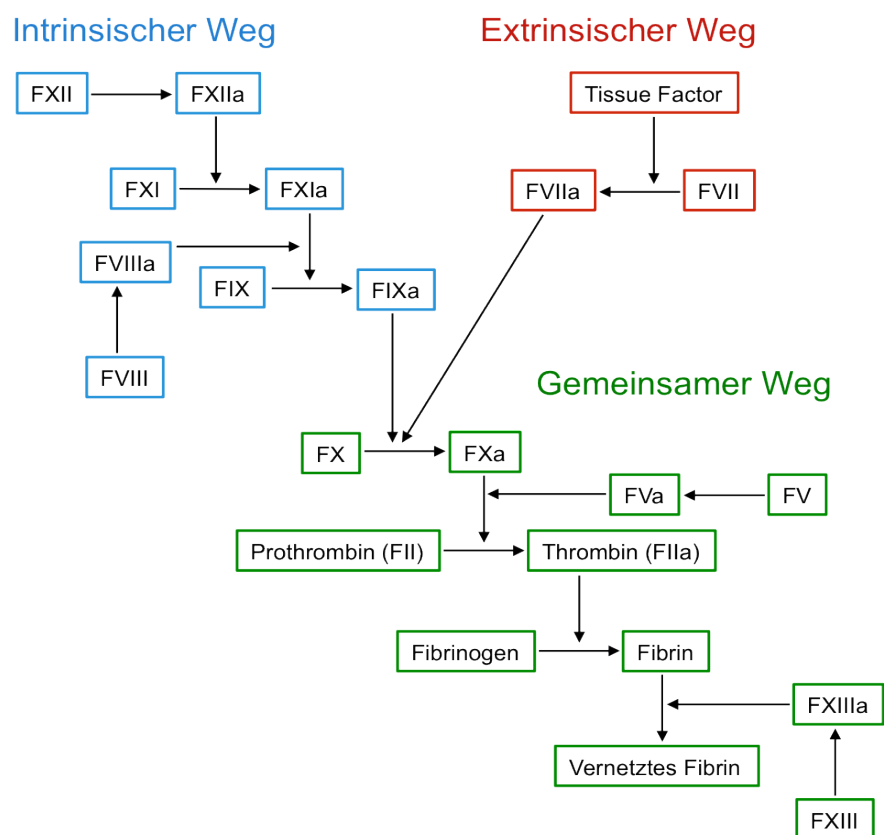
TF ist ein 47 kDa großes transmembranöses Glykoprotein<sup>92,93</sup>. Auch bekannt als Thrombokinase, Thromboplastin, CD142 oder FIII findet es sich vorwiegend auf perivaskulären Zellen, wie Fibroblasten, Perizyten und glatten Muskelzellen, wo es konstitutiv in aktiver Form exprimiert wird<sup>64,94</sup>. Erst bei Verletzung der Endothelschicht kommt TF in Kontakt mit zirkulierendem Blut und ein hämostatisches Koagel entsteht als effektiver Schutz gegen übermäßigen Blutverlust.

Daneben findet sich der sogenannte zirkulierende TF im Blut, wo er induzierbar auf aktivierten Zellen, v.a. Monozyten und Endothelzellen, oder konstitutiv exprimiert auf einigen Leukozyten<sup>21,63,65,95-97</sup> und auf Mikropartikeln zu finden ist<sup>22,98,99</sup>.

## 5.2 Funktion – Koagulationskaskade

Dem Molekül TF kommen unterschiedliche Funktionen bei der Signaltransduktion in Zellen zu. Bei physiologischen Prozessen wie der Angiogenese, aber auch bei pathologischen Vorgängen wie Tumorwachstum und Metastasierung, konnte seine Beteiligung nachgewiesen werden<sup>100,101</sup>.

Das Augenmerk soll aber den prokoagulatorischen Eigenschaften von TF gelten, der in seiner aktiven Form als Hauptinitiator der Koagulationskaskade fungiert<sup>2,102-105</sup>.



**Abbildung 5:** Schematische Darstellung der Koagulationskaskade.

Der intrinsische Gerinnungsweg (blau gerahmt) umfasst die Faktoren XII, XI, IX und VIII; der extrinsische Weg (rot gerahmt) den Gerinnungsfaktor VII und TF. Beide Wege haben die gleiche Endstrecke, den gemeinsamen Weg (grün gerahmt), der in die Fibrinbildung mündet.

Die plasmatische Gerinnung wird in den extrinsischen und den intrinsischen Weg unterteilt, deren letzte Schritte gleich verlaufen und deshalb als gemeinsamer Weg bezeichnet werden.

Klassischerweise erfolgt die Aktivierung des extrinsischen Weges durch Kontakt von TF, der vorwiegend auf Zellen der Media und Adventitia vorkommt, mit im Blut zirkulierendem FVII. Beide Faktoren komplexieren zum aktiven TF-FVIIa-Komplex, welcher die Aktivierung des FX zu FXa katalysiert.

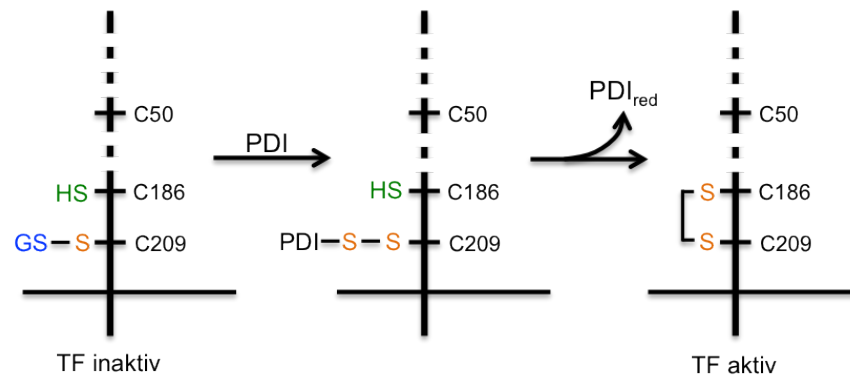
Startpunkt des intrinsischen Weges der Koagulationskaskade ist die, durch Kontakt mit negativ geladenen Oberflächen bedingte, autokatalytische Aktivierung von FXII zu FXIIa. Über die Zwischenschritte der Bildung von FXIa und FIXa mündet auch dieser Weg in der Aktivierung des Zymogens FX zu FXa.

Der gemeinsame Weg, beginnend mit der Entstehung von FXa, gipfelt in der Bildung von Fibrin. Als sogenannter Prothrombinaktivator konvertiert FXa, der mit seinem Cofaktor FVa komplexiert, Prothrombin zu Thrombin, das seinerseits proteolytisch aktiv ist und lösliches Fibrinogen in Fibrin umwandelt. Die Quervernetzung der gebildeten Fibrinpolymere wird durch den ebenfalls von Thrombin aktivierten FXIIIa katalysiert und führt zur Konsolidierung des Thrombus<sup>2</sup>.

### **5.3 Regulation der Aktivität**

Die Anwesenheit von TF im Gefäßlumen macht Regulationsmechanismen erforderlich, die eine spontane Gerinnungsaktivierung unterdrücken. Heute ist bekannt, dass TF in zwei funktionell unterschiedlichen Formen vorliegen kann: 1.) inaktiv, kryptisch, ohne prokoagulatorische Eigenschaften oder 2.) aktiv und hoch prokoagulatorisch<sup>106,107</sup>.

Unter physiologischen Bedingungen liegt zirkulierender TF auf Zellen und Mikropartikeln in inaktiver Form vor. Für die Konversion von der kryptischen in die aktive Form ist das Enzym PDI verantwortlich<sup>75</sup>. Während PDI bei intakter Gefäßwand intravaskulär nicht detektiert werden kann, wird es aus aktivierten Thrombozyten, im Falle einer Gefäßwandverletzung auch aus rupturierten Endothel- und SMC-Zellen, lokal in die Blutbahn entlassen<sup>75,108,109</sup>.



**Abbildung 6:** Aktivierung von TF durch PDI.

Die freie Thiolgruppe des inaktiven TF-Proteins (blau, links) wird in einer Isomerisierungsreaktion durch das Enzym PDI in eine Disulfidbrücke umgewandelt (orange, rechts).

Chemisch gesehen kommt es durch das Enzym PDI zu einer Isomerisierungsreaktion, bei der die freien Thiolgruppen der Cysteinreste 186 und 209 zu einer Disulfidbrücke verbunden werden, wodurch sich die Konformation von TF derart ändert, dass die Bindungsstelle für FVII frei zugänglich wird<sup>75</sup>.

#### **5.4 Rolle für die Entstehung der venösen Thrombose**

Mehrfach wurde schon vermutet, dass TF die Entstehung einer spontanen venösen Thrombose auslösen kann<sup>110,111</sup>. Giesen et al. bewiesen in ex vivo Versuchen, dass zirkulierender TF in aktiver Form im Blut gesunder Spender vorkommt, dass dieser TF zur Thrombusbildung beiträgt und dass er von Leukozyten abstammt<sup>98</sup>. Zudem wurde TF immunhistologisch in humanen venösen Thromben nachgewiesen<sup>112,113</sup>.

Auch im Tiermodell der vollständigen Stase war ein positiver Nachweis für TF auf Leukozyten, die am Endothel adhärten oder in den Thrombus eingebaut wurden und für die angrenzenden Endothelzellen möglich<sup>21</sup>. Genetisch modifizierte Mäuse, die nur 1 % der physiologischen TF-Menge exprimieren - sogenannte low TF Mäuse - entwickelten im venösen Stase- und Stenosemodell deutlich kleinere und weniger Thromben<sup>24,114</sup>. In einer weiteren Studie reduziert der Einsatz des TF:FVIIa-Komplex-Inhibitors die Thrombusbildung in Primaten<sup>115</sup>.

Aus diesen Ergebnissen lässt sich ableiten, dass zirkulierender TF von herausragender Bedeutung für die Initiierung und Progression der Thrombusbildung ist und dass eine TF-Defizienz (low-TF Tiere) bzw. Funktionsverlust (Inhibitorversuche) massiv zur Reduktion der Thrombusinzidenz und -größe beiträgt.

## **6. VENÖSE THROMBOSE UND TUMORLEIDEN**

### **6.1 Venöse Thrombose bei Tumorpatienten**

Schon Mitte des 19. Jahrhunderts wurde der Zusammenhang zwischen gesteigerter Koagulabilität und Thrombosebildung bei Tumorpatienten beobachtet. Dieses von Armand Trousseau 1865 beschriebene Phänomen ist als Trousseau Syndrom bekannt<sup>1</sup>.

Die Mechanismen, die der Tumor-Gerinnungs-Achse zu Grunde liegen sind zahlreich. Die enge Interrelation zwischen Tumorbiologie, Koagulation und Inflammation stehen deshalb im Mittelpunkt des Interesses. Abweichungen von den physiologischen Gerinnungsparametern sind bei Tumorpatienten häufig zu beobachten. Eine veränderte Fibrinbildung oder das vermehrte Auftreten von Gerinnungsbeiprodukten, wie D-Dimer oder Thrombin-Antithrombin-Komplex, sind in vielen Fällen zu registrieren<sup>116</sup>.

Tumorzellen tragen auf unterschiedliche Weise zur Aktivierung des hämostatischen Systems bei: Durch die Expression von prokoagulativen Proteinen (z.B. TF und dem sog. Cancer Procoagulant) und Lipiden (anionische Phospholipide), Freisetzung von inflammatorischen Zytokinen (z.B. TNF- $\alpha$  oder IL-1 $\beta$ ) und durch die Vesikulation von (TF<sup>+</sup>) Mikro-partikeln<sup>117,118</sup>.

Heute weiß man, dass Tumorpatienten mit einem etwa 6fach höheren Risiko an venöser Thromboembolisation leiden<sup>119,120</sup> und dass TVT die häufigste vaskuläre Dysfunktion bei Tumorpatienten ist<sup>121</sup>. Symptomatische TVT wirkt sich nachgewiesener Maßen negativ auf die Lebensqualität und die Prognose von Tumorpatienten aus<sup>122</sup>. Es ist davon auszugehen, dass ca. 15 % aller Tumorpatienten im Verlauf ihrer Krankheit eine TVT entwickeln<sup>34,123</sup>. Besonders hoch ist die Inzidenz bei hochgradig malignen Tumoren vom Typ mucinöses Adenokar-



zinom, v.a. bei Ovarial-, Prostata- und Gastrointestinalkarzinomen<sup>87,124,125</sup>. Das Pancreaskarzinom lässt mit einer Thromboseinzidenz von bis zu 57 % die stärkste Korrelation von Tumorleiden und Thrombose erkennen<sup>126-128</sup>.

In vielen Fällen endet die Bildung tiefer venöser Thromben und das Auftreten von Lungenemboli letal. Damit rangiert die VTE trotz prophylaktischer Gabe von Antikoagulantien in der Bilanz der häufigsten Todesursachen bei Tumorkranken direkt hinter dem Grundleiden<sup>129</sup>.

## **6.2 Mikropartikel bei venöser Thrombose**

Dem heutigen Stand der Forschung folgend ist die erhöhte Gerinnungsbereitschaft teilweise prokoagulatorischen Mikropartikeln, die von Tumorzellen in die Blutbahn entlassen werden, zu zuschreiben<sup>4,120,130</sup>. TF, von Tumorzellen exprimiert<sup>131</sup> und auf tumorösen Mikropartikeln im Blut von Tumorpatienten nachweisbar<sup>110,132-134</sup>, gilt als Träger der prokoagulatorischen Aktivität und es häufen sich die Belege, dass zirkulierende TF<sup>+</sup> Mikropartikel mit erhöhter Gerinnungsbereitschaft bei Tumorerkrankung eine Rolle spielt.

Beispielsweise zeigten Mikropartikel, gewonnen aus kultivierten Brust- und Pancreaskarzinomzellen, in vitro eine etwa 200fach höhere prokoagulatorische Aktivität im Vergleich zu Mikropartikel-freiem Plasma sowie eine doppelt so hohe Thrombinbildungsrate, die auf Phosphatidylserin und TF zurück zu führen war<sup>132</sup>.

In einem anderen Versuchsansatz führten Plasmamikropartikel von Tumorpatienten mit TVT in vitro zu einer deutlich erhöhten Mikropartikel-assoziierte TF-Aktivität im Vergleich zu Patienten ohne TVT<sup>134,135</sup>.

In einer retrospektiven Studie evaluierten Zwicker et al. die Anzahl und Größe von TF<sup>+</sup> Mikropartikeln bei 30 Tumorpatienten mit TVT, 60 ohne TVT und 22 Patienten ohne Tumorleiden aber idiopathischer TVT mit Hilfe der impedanzbasierten Durchflusszytometrie. TF<sup>+</sup> Mikropartikel konnten bei allen Gruppen nachgewiesen werden, wobei die Werte bei Patienten mit Pancreaskarzinom (68 % positiv), aber auch anderen bösartigen Karzinomen, v.a. von Ovar, Brust, Colorectum (je 50 % positiv), besonders hoch waren. Deutlich geringere Werte

hatten tumorfreie Patienten. Diese Studie ergab, dass Patienten mit TF<sup>+</sup> Mikropartikeln im Blut 4 mal häufiger an TVT leiden und unter einem 7fach höheren Risiko im Zuge der Tumorerkrankung TVT zu entwickeln<sup>134</sup>.

In einer weiteren retrospektiven Studie von Khorana mit 122 Pancreaskarzinompatienten war die VTE-Rate signifikant erhöht bei jenen Patienten mit hoher Tumorzell-TF-Expression im Vergleich zu jenen mit niedriger TF-Expression<sup>136</sup>.

Es bestehen aber auch gegensätzliche Berichte zur Rolle von Mikropartikel-assoziiertem TF. Den Untersuchungen von van Dormal zufolge konnten keine erhöhten TF-Spiegel bei Tumorpatienten nachgewiesen werden, da der Level von nicht zellgebundenem TF vergleichbar zu den Kontrollpatienten war. Zudem gab es keinen Unterschied zwischen Tumorpatienten mit VTE und solchen, die keine VTE entwickelten, im Hinblick auf die TF<sup>+</sup> Mikropartikelanzahl. Allerdings haben die Mikropartikel bei VTE-Tumorpatienten Tendenz vermehrt FXa zu bilden, die TF-abhängig war. Auch der Fibrinogenationstest war deutlich schneller im Plasma von VTE-Patienten<sup>137</sup>.

### **III. ZIELSETZUNG**

#### **1. STANDARDISIERUNG DES VENÖSEN THROMBOSEMODELLS**

Das komplexe Modell der murinen venösen Stenose soll zunächst auf die Parameter Flussreduktion nach Platzierung der Ligatur und Thrombusgewicht nach 48 h standardisiert werden.

#### **2. EINFLUSS PROKOAGULATORISCHER TUMORÖSER MIKROPARTIKEL AUF DIE STENOSE-INDUZIERTEN TVT**

Zwei Typen tumoröser Mikropartikel sollen auf ihr prokoagulatorisches Potential hin untersucht werden. Als Vergleichsgruppe werden physiologischerweise im Blut vorkommende Blut-Mikropartikel herangezogen, um Rückschlüsse auf die veränderte Gerinnungsneigung ziehen zu können.

Zudem sollen, aufbauend auf Vorarbeiten der Arbeitsgruppe, die Mechanismen der Mikropartikel-induzierten Thrombose in vivo untersucht werden. Verschiedene Zellen bzw. spezifische Proteine beeinflussen das Gerinnungsgeschehen in vivo und es soll im Detail geklärt werden, ob diese Faktoren auch bei der Mikropartikel-induzierten Thrombose von Bedeutung sind. Beurteilt werden soll der Effekt von Mikropartikeln bei Knockout von P-Selektin, GPIb sowie myeloidem TF. Desweiteren wird die Auswirkung von Mikropartikeln bei Depletion von Thrombozyten bzw. Neutrophilen erprobt. Auch der Einfluss der Blockade des intrinsischen Gerinnungsweges im Mikropartikel-Setting soll beurteilt werden. In einem weiteren Ansatz wird versucht, den mikropartikulären TF mittels spezifischer Antikörper zu blockieren.

#### **3. BEURTEILUNG DER DYNAMIK DER MIKROPARTIKEL-INDUZIERTEN VENÖSEN THROMBOSE IM STENOSEMODELL**

Mittels Ultraschall wird die Entstehungsdynamik venöser Thromben in zeitlicher

Abhängigkeit von den Mikropartikelinjektionen untersucht.  
Die in vivo Darstellung der Thrombusgestalt vor Versuchsende erfolgt an einigen repräsentativen Tieren beispielhaft mittels CT.

## IV. MATERIAL UND METHODEN

### 1. VERSUCHSTIERE

Grundlage dieser Arbeit sind in vivo Untersuchungen an der Maus. Die einfache Haltung, kurze Generationszeiten bei guten Zuchterfolgen, leichtes Handling und nicht zuletzt die Existenz unterschiedlichster Genotypen machen die Maus zu einem geeigneten Versuchstier. Die Rolle tumoröser Mikropartikel für die pathologische Thrombogenese wurde, neben dem weit verbreiteten Wildtypstamm C57Bl/6J, an verschiedenen transgenen Mauslinien untersucht.

#### 1.1 Wildtypstamm C57Bl/6J

Der Mausstamm C57Bl/6J ist der für Tierversuche an der Maus am häufigsten verwendete Inzuchtstamm. Zudem stellt er den genetischen Hintergrund vieler transgener Stämme<sup>138</sup>.

C57Bl/6J Mäuse liegen den Experimenten zur Mikropartikel-induzierten Thrombogenese als native Kontrolltiere zu Grunde. Depletionsversuche zur Untersuchung des Einflusses von Neutrophilen und Thrombozyten wurden ebenso an C57Bl/6J Tieren durchgeführt, wie Untersuchungen zur Rolle des mikropartikelären TF und zum Einfluss des intrinsischen Gerinnungsweges (FXII-Inhibition).

Dieser Stamm dient als Hintergrund der verwendeten genetisch manipulierten Linien.

#### 1.2 Genetisch manipulierte Stämme

Der kongene Stamm B6.129s7-Selp (tm1Bay)/J sowie die transgenen Stämme GPIb/IL-4R und TF<sup>flox/flox</sup> LysM Cre kamen im Zuge dieser Arbeit zum Einsatz.

Der Stamm B6.129s7-Selp (tm1Bay)/J (kurz SELP<sup>-/-</sup>) zeichnet sich durch einen Knockout von P-Selektin auf Endothelzellen und auf Thrombozyten aus<sup>139</sup>. Die

Injektion von Blut- und L3.6pl-Mikropartikeln sollte Aufschluss über den Effekt des Adhäsionsrezeptors P-Selektin auf die durch tumoröse Mikropartikel induzierte Thrombusbildung geben.

Bei Tieren des Stammes GPIb/IL-4R ist die extrazelluläre Domäne des thrombozytären GPIb $_{\alpha}$  durch die  $\alpha$ -Untereinheit des humanen IL-4-Rezeptors ersetzt, wodurch die Interaktion mit vWF, dem Hauptliganden von GPIb $_{\alpha}$ , unterbunden wird<sup>140,141</sup>. Verwendung fanden Tiere dieses Stammes zur Beurteilung der Rolle von GPIb $_{\alpha}$  bei der Tumormikropartikel-induzierten TVT. Im Detail sollten die Auswirkungen einer fehlenden GPIb $_{\alpha}$ -vWF-Interaktion bei GPIb $_{\alpha}^{-/-}$  Tieren im Zuge der Mikropartikel-assoziierten TVT untersucht werden.

Schließlich sollte durch Einsatz von TF<sup>flox/flox</sup> LysM Cre-positiven (Cre<sup>+</sup>) Tiere erforscht werden, ob ein Mangel an myeloidem TF die Entstehung eines Thrombus nach Injektion von Mikropartikeln beeinflusst. Cre-negative (Cre<sup>-</sup>) Tiere dienten als Kontrolle. Durch Insertion des Cre-Gens innerhalb des Lysozym M-Locus myeloider Zellen und flankieren des TF-Gens mit der loxP-Sequenz kommt es bei der Expression der Cre-Rekombinase zur zellspezifischen Exzision des geflochten Gens<sup>142-144</sup>.

### **1.3 Tierzucht**

Insbesondere im Falle der genetisch manipulierten Mauslinien erfolgte die Zucht im eigenen Tierstall. Generell lag der Zucht eine bigame Verpaarung zu Grunde. Ein Bock wurde mit zwei weiblichen Tieren gehalten und nach einem bestimmten Zeitraum, spätestens nach positiver Trächtigkeitskontrolle, wieder von den Weibchen getrennt. Für die Aufzuchtphase von vier Wochen blieben die Jungtiere beim Muttertier. Danach wurden männliche und weibliche Geschwister getrennt und die Alttiere konnten erneut der Verpaarung zugeführt werden.

## **1.4 Tierhaltung**

### **1.4.1 Tierhaltung allgemein**

Die Unterbringung der Tiere getrennt nach Stämmen erfolgte in sogenannten IVCs (individuell ventilierte Käfige) (TECNIPLAST, Hohenpeißenberg), die leicht zu reinigen, sterilisierbar, durchsichtig und einzeln belüftbar sind. Die Käfige entsprachen dem Typ III mit einer Grundfläche von ca. 820 cm<sup>2</sup>. Um eine hygienische Abschirmung der Tiere zu gewährleisten wurden die IVCs mit einer speziellen Haube verschlossen und über ein Belüftungssystem HEPA-gefilterte, konditionierte Raumluft in die Haltungs- und Zuchtkäfige geleitet, wobei eine stündliche Luftumwälzung von ca. 50-70 Luftwechseln gegeben war. Zudem wurde über das Belüftungssystem das „Mikroklima“ in den Käfigen kontrolliert und eine stabile Luftfeuchtigkeit von 50-60 % sowie eine Temperatur von 20-24° C eingestellt. Der Tag-Nacht-Rhythmus wurde durch einen zwölfstündigen Hell-Dunkel-Rhythmus geregelt, bei dem während der Hell-Phase 50-100 Lux erreicht wurden.

Da Mäuse sozial lebende Tiere sind, wurden sie stets in Gruppen von 2-6 Tieren gehalten. Nur unverträgliche Zuchtböcke saßen in Einzelkäfigen<sup>145</sup>.

Ausgestattet waren die Haltungs- und Zuchtkäfige mit einem speziellen Weichholzgranulat als Einstreu (LIGNOCEL® BK 8-15, J. Rettenmaier & Söhne, Rosenberg), welches besonders weich und saugfähig ist und deshalb nur einmal in der Woche gewechselt werden musste. Desweiteren fand sich in jedem Käfig ein autoklavierbares, rotes Plastikhäuschen (Mouse House, TECNIPLAST, Hohenpeißenberg) sowie sterilisierter Zellstoff, um den Tieren die Möglichkeit zum Ausleben ihres natürlichen Spiel- und Nestbautriebes zu geben und das Wohlbefinden zu steigern.

Allen Tieren stand pelletiertes, artgerechtes Futter (#1320 Ratte/Maus Haltungsdiät, Altromin, Lage) und sterilisiertes Leitungswasser ad libitum zur Verfügung.

Das vorliegende Tierversuchsvorhaben wurde von der Regierung von Oberbayern gemäß § 8 des Deutschen Tierschutzgesetzes genehmigt (Akten-

zeichen: 55.2-1-54-2531-144-08 und 55.2-1-54-2531-145-12).

#### **1.4.2 Tierhaltung im 48 h Versuch**

Grundlage dieser Arbeit ist die Durchführung chronischer Tierversuche, bei denen die Tiere wieder aus der Narkose erwachten und für weitere 48 h überleben. Die Haltungsbedingungen wichen während des Versuchs von der allgemeinen Tierhaltung ab.

Bereits 30 min vor Antagonisierung der Narkose erhielten die Tiere eine erste Injektion à 30 µg Buprenorphin (Temgesic, Reckitt Benckiser, Hull, UK) subkutan. Dieses halbsynthetische Opioid sollte, zweimalig im Abstand von 12 h appliziert, eine effektive postoperative Analgesie gewährleisten.

Sobald die Tiere aus der Narkose erwachten, wurden sie einzeln sitzend in Käfigen (Typ II, TECNIPLAST, Hohenpeißenberg) gehalten. Um die Staubbelastung zu reduzieren und die Forscher vor möglichen Allergenen zu schützen, wurde die Einstreu entfernt und die Käfige mit Tüchern (Wypall, Kimberly-Clark, Koblenz) ausgelegt. Kosmetiktücher (Kleenex, Kimberly-Clark, Koblenz) dienten den Tieren als Nestbau- und Spielmaterial. Mit dem Ziel, die Mäuse möglichst stressfrei und abgeschirmt von akustischen, optischen und olfaktorischen Reizen unterzubringen, wurden sie in einem speziellen, belüfteten Tierhaltungsschrank (Ventilated Cabinet, TECNIPLAST, Hohenpeißenberg) gehalten. Das Ventilated Cabinet bot zudem den Vorteil, dass die Mäuse durch die rote, für die Tiere undurchsichtige Plexiglasscheibe, jederzeit in Augenschein genommen werden konnten ohne die Einzelkäfige zu bewegen und die Tiere zusätzlich zu stressen.

Zur Überwachung des Allgemeinbefindens während des 48 h-Versuchs wurden die Tiere regelmäßig im Hinblick auf ihren Habitus und das Verhalten, auf Nahrungsaufnahme, Kot- und Urinabsatz sowie die Bewegungsaktivität untersucht. Die Befunde wurden schriftlich dokumentiert und das Allgemeinbefinden mit Hilfe eines Scoresystems beurteilt. Als Abbruchkriterium für den Versuch, der die Euthanasie des Tieres zur Folge hatte, galt ein einmaliger Score von 2 in einem der genannten Kontrollkategorien oder dreimal hintereinander der Score von 1.



## **2. MIKROPARTIKEL**

### **2.1 Zellulärer Ursprung**

In der vorliegenden Arbeit kamen verschiedene Typen von Mikropartikeln zum Einsatz, deren Einfluss auf die Phlebothrombogenese bei lokal verringerter Blutflussgeschwindigkeit eruiert werden sollte: Blut-, FG- und L3.6pl-Mikropartikel. Während Blut-Mikropartikel physiologischerweise im Blut nachweisbar sind, stammen FG- und L3.6pl-Mikropartikel von tumorösen Zelllinien ab.

#### **2.1.1 Blut-Mikropartikel**

Mikropartikel sind im Blut eines jeden Individuums nachweisbar, da sie von aktivierten oder apoptotischen Zellen abgeschnürt und in die Vaskulatur entlassen werden (Abs. 4.2). Dementsprechend erfolgt die Gewinnung aus dem Vollblut von humanen, gesunden Spendern.

#### **2.1.2 Tumoröse Mikropartikel**

Die beiden Typen tumoröser Mikropartikel, die in dieser Arbeit auf ihr prokoagulatorisches Potential hin untersucht wurden, stammen von der selben pancreaskarzinomatösen Zelllinie ab, unterschieden sich aber wesentlich in ihrer Kapazität Metastasen zu bilden.

##### **2.1.2.1 FG-Mikropartikel**

Bereits 1980 etablierten Morgan et al. humane Pancreaskarzinomzellen, welche aus einer Metastase des axillaren Lymphknotens gewonnen wurden, für die Zellkultur. Die Zelllinie erhielt den Namen COLO 357<sup>146</sup>. Tumorzellen einer schnell wachsenden Variante (fast growing = FG) dieser COLO 357 Linie zeichnen sich zwar durch schnelles Wachstum aus, ihre Metastasierungsneigung ist hingegen gering.

### **2.1.2.2 L3.6pl-Mikropartikel**

Um ausgehend von dieser schnell wachsenden Zelllinie Tumorzellen mit hoher Metastasierungskapazität zu erzeugen, wurden FG-Zellen von der Forschungsgruppe um Vezeridis in die Milz von Nacktmäusen injiziert. Diese Mäuse bildeten Lebermetastasen, deren Zellen geerntet, in der Zellkultur etabliert und als L3.3 designiert wurden<sup>147</sup>.

Im Weiteren wurde die Metastasierungsneigung der L3.3 Zellen in folgenden Passagen deutlich erhöht. Zu diesem Zweck wurden Tumorzellen der L3.3 Linie orthotop in das Pankreas von Nacktmäusen oder in das Milzparenchym injiziert. Lebermetastasen wurden geerntet und in Zellkultur etabliert. Nach 2-3 Passagen in vitro konnten die Zellen, nunmehr L3.4pl (pancreas – liver; im Falle der intrapancreatischen Injektion mit folgender Lebermetastase) bzw. L3.4sl (spleen-liver; im Falle der Milzinokulation) erneut für die in vivo Injektion bereit werden. Der gesamte Zyklus wurde zwei weitere Male wiederholt, bis schließlich L3.6pl bzw. L3.6sl Zellen vorlagen. Diese zeichnen sich durch schnelles Wachstum und hohe Metastasierungseigenschaften aus<sup>148</sup>.

Bruns et al. konnten im Vergleich von FG-, L3.6pl- und L3.6sl-Zellen, die erneut in die Milz oder das Pankreas von Nacktmäusen inokuliert wurden nachweisen, dass L3.6pl-Zellen die größte Metastasierungsrate aufweisen. In vitro proliferieren L3.6pl-Zellen schneller als L3.6sl- und als FG-Zellen und verfügen über eine höhere Zellmotilität<sup>148</sup>.

## **2.2 Isolierung**

### **2.2.1 Isolationsprotokoll Blut-Mikropartikel**

Frisch entnommenes Vollblut gesunder humaner Spender wurde bei Raumtemperatur für 15 min bei 160 g ohne Bremse zentrifugiert. Nach zwei weiteren Zentrifugationsschritten des Mikropartikel-haltigen Plasmas bei 855 g für 20 min ohne Bremse konnte der Überstand, das zellfreie Plasma, zu je 1000 µl in Eppendorf Röhrchen aliquotiert werden. Die Mikropartikel wurden durch erneutes, zweimaliges Zentrifugieren bei 17740 g für 30 min ohne Bremse pelletiert. Der Überstand wurde alsdann verworfen und die Mikropartikel in PBS (Phosphat

buffered saline) resuspendiert um eine Proteinbestimmung nach Lowry durchzuführen. Entsprechend dem Ergebnis der Proteinbestimmung wurden die Mikropartikelsuspensionen zu Portionen à 150 µg Protein vereinigt.

Eine Lagerung in Puffer bei 8° C war für ca. eine Woche möglich. Vor der Anwendung in vivo erfolgte ein letzter Zentrifugationsschritt bei 17740 g für 30 min, um das Mikropartikelpellet anschließend in 200 µl steriler Natriumchloridlösung (NaCl) zu resuspendieren.

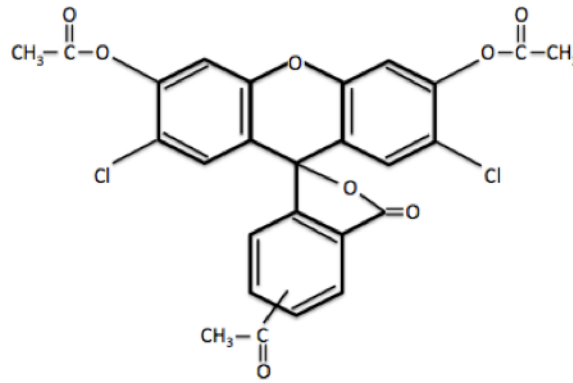
### **2.2.2 Isolationsprotokoll tumoröser Mikropartikel**

Nach Entnahme des Mediums aus den Zellkulturflaschen und verbringen in 50 ml Falcons konnte es in zwei aufeinander folgenden Schritten bei 1430 x g für 20 min bei Raumtemperatur zentrifugiert werden. Die zellfreie Lösung wurde zu je 1000 µl in Eppendorf Röhrchen aliquotiert. Diese wurden zweimal zentrifugiert: 30 min bei 17740 x g ohne Bremse. Nach Verwerfen des Überstands erfolgte die systematische Vereinigung der Pellets in PBS mit anschließender Proteinbestimmung nach Lowry. Lagerung und Aufbereitung für die i.v. Injektion folgten dem Protokoll der Blut-Mikropartikel.

## **2.3 Markieren von Mikropartikeln**

### **2.3.1 DCF**

Um Mikropartikel in den immunhistologischen Schnitten von anderen Strukturen differenzieren zu können wurden sie vor der Applikation mit DCF, einem grün fluoreszierenden Farbstoff, markiert.



**Abbildung 7:** Strukturformel von DCF.

DCF (5-(and-6)-carboxy-2',7'-dichlorofluorescein diacetat) per se ist zunächst farblos und diffundiert passiv in die Zellen / Mikropartikel. Die grüne Fluoreszenz (Emissionsmaximum 530 nm) resultiert aus der Deacetylierung durch intrazelluläre / intramikropartikuläre Esterasen<sup>149</sup>.

Zur Markierung der Mikropartikel wurde das in 1000 µl PBS aufgenommene Pellet bei Raumtemperatur lichtgeschützt für 2 min mit 5 µl einer 4,48 mM DCF-Lösung inkubiert. Der Inkubation folgte ein Waschschrift mit PBS, die abschließende Zentrifugation bei 17440 x g für 30 min und schließlich die Resuspendierung in steriler NaCl zur in vivo Anwendung.

### **2.3.2 anti-TF Antikörper**

Die Blockade des mikropartikulären TF sollte Aufschluss über die Rolle dieses Proteins für die Thrombogenese geben.

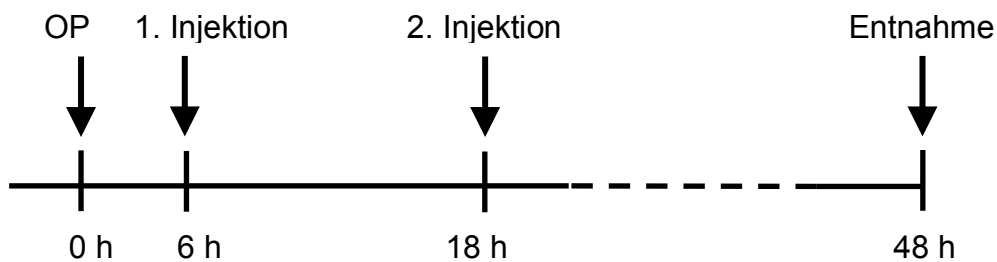
Zu diesem Zweck wurde das Mikropartikelpellet in 100 µl PBS resuspendiert und mit dem Antikörper (PE mouse anti-human CD142, BD Pharmingen, Heidelberg) in einer Konzentration von 45 µg / 150 µg Protein vermischt. Nach einstündiger Inkubation bei Raumtemperatur und zweimaligem Waschen mit PBS, wobei die Zentrifugation bei 17440 x g für 30 min erfolgte, konnte das Pellet trocken gelagert oder gleich in sterile NaCl aufgenommen werden.

### 2.3.3 anti-TF-Isotyp

Die Behandlung der Mikropartikel mit dem anti-TF-Isotyp (Purified mouse IgG1 kappa Isotype Control, BD Pharmingen, Heidelberg) folgte dem gleichen Regime wie die Behandlung mit anti-TF-Antikörper. Die Konzentration des Isotyps betrug ebenfalls 45 µg / 150 µg Protein

## 2.4 Mikropartikelinjektion

Über die Vena coccygea lateralis erhielten die Mäuse im Abstand von 6 h und 18 h nach der Ligatur jeweils eine Portion Mikropartikel zu 150 µg suspendiert in 200 µl NaCl.



**Abbildung 8:** Zeitlicher Verlauf des chronischen Versuchs.

Zur Schwanzveneninjektion wurde die Maus in einen Restrainter (Broome HAR-52-04, Föhr Medical Instruments GmbH), einer Fixationsvorrichtung, die freien Zugang zum Schwanz ermöglicht, verbracht.

An der Schwanzbasis wurde das Blut zwischen Zeige- und Mittelfinger gestaut. Einen hyperämisierenden Effekt sollte ein mit warmem Wasser gefüllter, auf den Schwanz aufgelegter Handschuh haben. Vor dem Einstich wurde die Haut mit Octeniderm (Schülke & Mayr GmbH, Norderstedt) desinfiziert.

Die Mikropartikelsuspension wurde dabei über einen Katheter i.v. als Bolus appliziert. Dieser bestand aus einem ca. 15 cm langen Polyethenschlauch (Portex, Polythene Tubing, 0,28 mm ID 0,61 mm OD, Smiths Medical International, Hythe, USA) mit aufgesetzter 30 G Kanüle (30 G, BD Microlance, Becton Dickinson Labware, Franklin Lakes, USA), an die eine 1 ml Spritze (B. Braun,

Melungen) angeschlossen war. Am vorderen Ende des Katheterschlauchs war die Nadel einer 30 G Kanüle eingeführt, die in die geweitete Vena coccygea lateralis eingestochen wurde.

### **3. OPERATIONSVERFAHREN**

#### **3.1 Narkose**

##### **3.1.1 Narkotisierung**

Mit dem Ziel die Stressbelastung bei der Applikation des Injektionsnarkotikums sowie das Verletzungsrisiko für das Tier so gering wie möglich zu halten, wurde die Narkose mit Isofluran (Forene 100 %, Abbot, Wiesbaden) eingeleitet. In einer Narkosekammer aus Plexiglas, welche direkt an den Isofluranverdampfer angeschlossen werden konnte, inhalierten die Tiere ein 3 %iges Isofluran-Sauerstoffgemisch. Sobald die Stellreflexe erloschen wurde die Maus aus der Kammer entnommen und in der kurzen Rekonvaleszenzzeit die Tripelnarkose intraperitoneal (i.p.) appliziert. Anschließend verblieben die Tiere, geschützt vor optischen und akustischen Reizen, in einer Einschlafbox, bis auch der Zwischenzehenreflex erloschen war.

Die eigentliche Operation zur Stenosierung der Vena cava caudalis erfolgte unter Allgemeinanästhesie, einem reversiblen Zustand der Bewusstlosigkeit / Hypnose, Immobilisation / Relaxation und Schmerzausschaltung / Analgesie.

Durch die Applikation von Injektionsnarkotika sollten die Tiere in das chirurgische Toleranzstadium gebracht werden. Zur Anwendung kam eine Kombination der Wirkstoffe Medetomidin (Dorbene vet 1 mg/ml, Pfizer GmbH, Karlsruhe), Fentanyl (Fentanyl 0,5 mg Rotexmedica GmbH, Trittau) und Midazolam (Midazolam-hameln 5 mg/ml, Hameln Pharmaceuticals GmbH, Hameln).

**Medetomidin**, ein sedativ-hypnotisches Analgetikum, gehört zur Wirkstoffklasse der  $\alpha_2$ -Agonisten. Neben seiner muskelrelaxierenden Wirkung hat Medetomidin sowohl viszeral als auch peripher analgetische Eigenschaften. Allerdings wirkt Medetomidin depressiv auf das Herzkreislaufsystem. Unerwünschte Nebenwirkungen sind vor allem Hypotension, Bradycardie, Atemdepression und

Hypothermie.

**Fentanyl**, ein synthetisches Opioid, findet aufgrund seiner potenten Schmerzhemmung Einsatz. Als Nebenwirkung ist eine Katatonie möglich.

**Midazolam** reiht sich in die Gruppe der GABAergen Benzodiazepine. Es wirkt sedierend und hat muskelrelaxierende und antikonvulsive Effekte<sup>150</sup>.

Da keines dieser Pharmaka alleine alle Kriterien der Allgemeinanästhesie (Hypnose, Analgesie und Relaxation) erfüllt, kamen sie kombiniert zum Einsatz. Vorteil dieser Tripelnarkose ist die vollständige Antagonisierbarkeit. Zudem sinkt das Risiko für Nebenwirkungen, da die Nutzung der additiven Effekte eine Reduktion der Einzeldosis jedes Pharmakons erlaubt.

Die Versuchstiere erhielten eine Mischung aus 0,5 mg/kg Medetomidin, 0,05 mg/kg Fentanyl und 5,0 mg/kg Midazolam, verdünnt mit steriler NaCl (Isotonische Kochsalzlösung, Fresenius, Bad Homburg v.d.H.) auf 0,35 ml Gesamtvolumen, die i.p. appliziert wurde. Erfahrungsgemäß gelangten die Tiere nach 10-20 min in das gewünschte chirurgische Toleranzstadium III2.

Für die nicht invasiven und schmerzlosen Untersuchungsverfahren Sonographie und Computertomographie wurden die Tiere lediglich mit einem 2 %igen Isofluran-Sauerstoffmischung anästhesiert.

| Wirkstoff   | Handelsname      | Konzentration | Dosierung  | Gabe |
|-------------|------------------|---------------|------------|------|
| Medetomidin | Dorbene vet.     | 1 mg/ml       | 0,5 mg/kg  | i.p. |
| Fentanyl    | Fentanyl 0,5 mg  | 0,5 mg/ml     | 0,05 mg/kg | i.p. |
| Midazolam   | Midazolam-hameln | 5 mg/ml       | 5,0 mg/kg  | i.p. |

**Tabelle 1:** Dosierung der vollständig antagonisierbaren Narkose bei der Maus.

### **3.1.2 Antagonisierung der Narkose**

Der weitaus größte Teil der Versuchstiere wurde nach erfolgreichem Beenden der Operation aus der Narkose erweckt, um nach weiteren 48 h den Grad der

Thrombusprogression untersuchen zu können. Für die Antagonisierung der Narkose bediente man sich einer Kombination der Wirkstoffe Naloxon (Naloxon-hameln 0,4 mg/ml, hameln Pharmaplast, Hameln), Atipamizol (Antisedan, Pfizer, Karlsruhe) und Flumazenil (Flumazenil Inresa 0,5 mg i.v., Inresa Arzneimittel GmbH, Freiburg).

**Naloxon** ist ein reiner, hochselektiver Opioidantagonist, der Fentanylmoleküle kompetitiv von den  $\mu$ -Rezeptoren verdrängt und somit dessen Wirkung aufhebt.

**Atipamizol** wirkt an  $\alpha_2$ -Adrenorezeptoren und ist der Antagonist für Medetomidin, der zentralnervös dessen Wirkung kompetitiv hemmt.

**Flumazenil** findet Einsatz als Benzodiazepin-Antagonist, der ebenfalls auf zentraler Ebene die Effekte von Midazolam aufhebt<sup>150</sup>.

2,5 mg/kg Atipamezol, 1,2 mg/kg Naloxon und 0,5 mg/kg Flumazenil wurden subkutan injiziert. Nach 5-10 min erwachten die Tiere und konnten in die vorbereiteten Käfige überführt werden.

| Wirkstoff  | Handelsname                      | Konzentration | Dosierung | Gabe |
|------------|----------------------------------|---------------|-----------|------|
| Naloxon    | Naloxon-hameln                   | 0,4 mg/ml     | 1,2 mg/kg | i.p. |
| Atipamizol | Antisedan                        | 5 mg/ml       | 2,5 mg/kg | i.p. |
| Flumazenil | Flumazenil Inresa<br>0,5 mg i.v. | 0,1 mg/ml     | 0,5 mg/kg | i.p. |

**Tabelle 2:** Dosierung der Antagonisten zur vollständig antagonisierbaren Narkose bei der Maus.

### 3.2 Vorbereitung des Operationsfeldes in der Linea alba

Gerade bei Operationen, die mit Eröffnung von Körperhöhlen einher gehen, ist sauberes und gründliches Arbeiten die Voraussetzung dafür, dass die Tiere, welche postoperativ erwachen, nicht an Infektionen erkranken.

Deshalb wurde der Arbeitsplatz vor jeder Operation mit zur Flächendesinfektion zugelassenem Sprühalkohol (Pursept-A, Merz Hygiene GmbH, Frankfurt am Main) desinfiziert. Auch das Operationsbesteck wurde direkt vor Operationsbe-



ginn erneut gereinigt.

Die Vorbereitung der narkotisierten Versuchstiere begann nach dem Erfassen des Körpergewichts mit der Rasur der Bauch- bzw. Halsregion (Ermila Magnum Handy, Wahl, Unterkirnach). Anschließend wurde das Operationsfeld unter Verwendung von Enthaarungscreme (Veet, Reckitt Benckiser, Mannheim) enthaart. Darauf folgte die Hautdesinfektion mittels Sprühalkohol (Cutasept F, Bode Chemie, Hamburg).

Sobald der OP-Bereich vorbereitet war, wurde Augensalbe (Bepanthen Augen- und Nasensalbe, Bayer, Leverkusen) aufgetragen und das Tier schließlich mit Klebeband (Transpore 3M, Health Care, Neuss) in Rückenlage auf der Wärmeplatte (Intraoperatives Tierbewärmungssystem IOW-3704, Föhr Medical Instruments GmbH, Seeheim-Ober Beerbach), welche die Körpertemperatur während der gesamten Versuchsdauer zwischen 36-39° C stabil hielt, unter dem Stereomikroskop (Stemi-2000, Fa. Zeiss, Jena) fixiert. Die Nase befand sich dabei in einer Kopfkammer, sodass eine kontinuierliche Versorgung mit Sauerstoff sichergestellt war. Zusätzlich konnte bei Bedarf Isofluran zugemischt werden. Zur Ausleuchtung des Operationsfeldes kam eine Kaltlicht-Schwanenhalslampe (Schott-Kaltlichtquelle KL200 und Schwanenhals-Lichtleiter, Zeiss, Göttingen) zum Einsatz. Unmittelbar vor dem chirurgischen Eingriff wurde der OP-Bereich nochmals mit Sprühalkohol (Cutasept F, Bode Chemie, Hamburg) entfettet und desinfiziert.

### **3.3 Jugulariskatheter**

Vor allem zur wiederholten Applikation von Fluoreszenzfarbstoffen während der Intravitalmikroskopie, aber auch zur sicheren Injektion größerer Volumina, von Zellen und Antikörpern, ist ein permanenter venöser Zugang von Vorteil. Ein geeignetes Gefäß zur Katheterisierung ist aufgrund der leichten Zugänglichkeit die Vena jugularis.

Die Katheterisierung erfolgte unter Allgemeinanästhesie (Abs. 3.1.1). Sobald das Tier ausreichend tief in Narkose lag konnte die ventrale Halsregion wie oben beschrieben rasiert und enthaart werden. Ist das Tier in Rückenlage fixiert

wurde die Haut mit Alkohol entfettet und desinfiziert. Um den Zugang zur Vena jugularis zu erleichtern wurde eine 1 ml Spritze (B. Braun, Melsungen) in den Nacken geschoben, sodass der Hals gestreckt war.

Der Hautschnitt erstreckte sich von caudal des Angulus mandibulae bis cranial des Sternums und verlief rechts paramedian. Die nun sichtbare Speicheldrüse (Glandula mandibularis) wurde behutsam caudal an der Apex ergriffen, stumpf freipräpariert und nach rostral verlagert. Die Vena jugularis dextra stellte sich dar und wurde ebenfalls durch stumpfe Präparation vom umgebenden Binde- und Fettgewebe getrennt. Ein erster Faden (Prolene Polypropylen, 7-0 metric, Ethicon, Norderstedt), welcher als Haltefaden fungiert, wurde caudal der vorgelegten Glandula mandibularis vorgelegt, geknotet, mit einer Moskitoklemme ergriffen und das Gefäß durch Zug rostral gestreckt. Jetzt spannte sich die Vena jugularis zeltförmig auf, was die weitere Präparation wesentlich erleichterte.

Im Weiteren legte man drei Fäden vor: Den Fixierfaden für den Katheter mit einer doppelten Ligatur möglichst weit caudal, einen zweiten Faden, welcher später die Inzision verengen sollte cranial davon und einen dritten Faden, der den Zufluss aus den Seitenästen der Vena jugularis unterbinden sollte. Die beiden letzteren Fäden wurden mit einer einfachen Ligatur vorgelegt.

Der Katheter, bestehend aus einem Polyethenschlauch (Portex, Polythene Tubing, 0,28 mm ID 0,61 mm OD, Smiths Medical International, Hythe, USA), einem Dreiwegehahn (Discofix C, B. Braun, Melsungen) und einer 2 ml Spritze (B. Braun, Melsungen), welche mit steriler NaCl gefüllt war, wurde spannungsfrei neben der Maus platziert. Um den Katheter in das Gefäß einführen zu können wurde die Gefäßwand nun vorsichtig ergriffen und mit Hilfe einer feinen Federschere inzidiert. Durch diese Inzision wurde der Katheter in das Gefäß eingeführt, die doppelt vorgelegte Ligatur zugezogen, um den Katheter in seiner Lage zu fixieren und anschließend die anderen beiden Ligaturen angezogen. Zusätzlich fixierte man den Katheter mittels Klebeband an der Kopfkammer. Ob der Katheter in Position lag wurde durch Spülung mit steriler NaCl geprüft. Um ein Austrocknen des Gewebes zu verhindern wurde es mit steriler NaCl benetzt und das Wundgebiet mit Parafilm (Pechiney, Chicago, USA) abgedeckt.

### **3.4 Venöse Stenose**

#### **3.4.1 Ligatur der Vena cava caudalis**

Die Induktion einer venösen Stenose durch partielle Ligatur der Vena cava caudalis wurde am narkotisierten und für den chirurgischen Eingriff vorbereiteten Tier in Rückenlage durchgeführt.

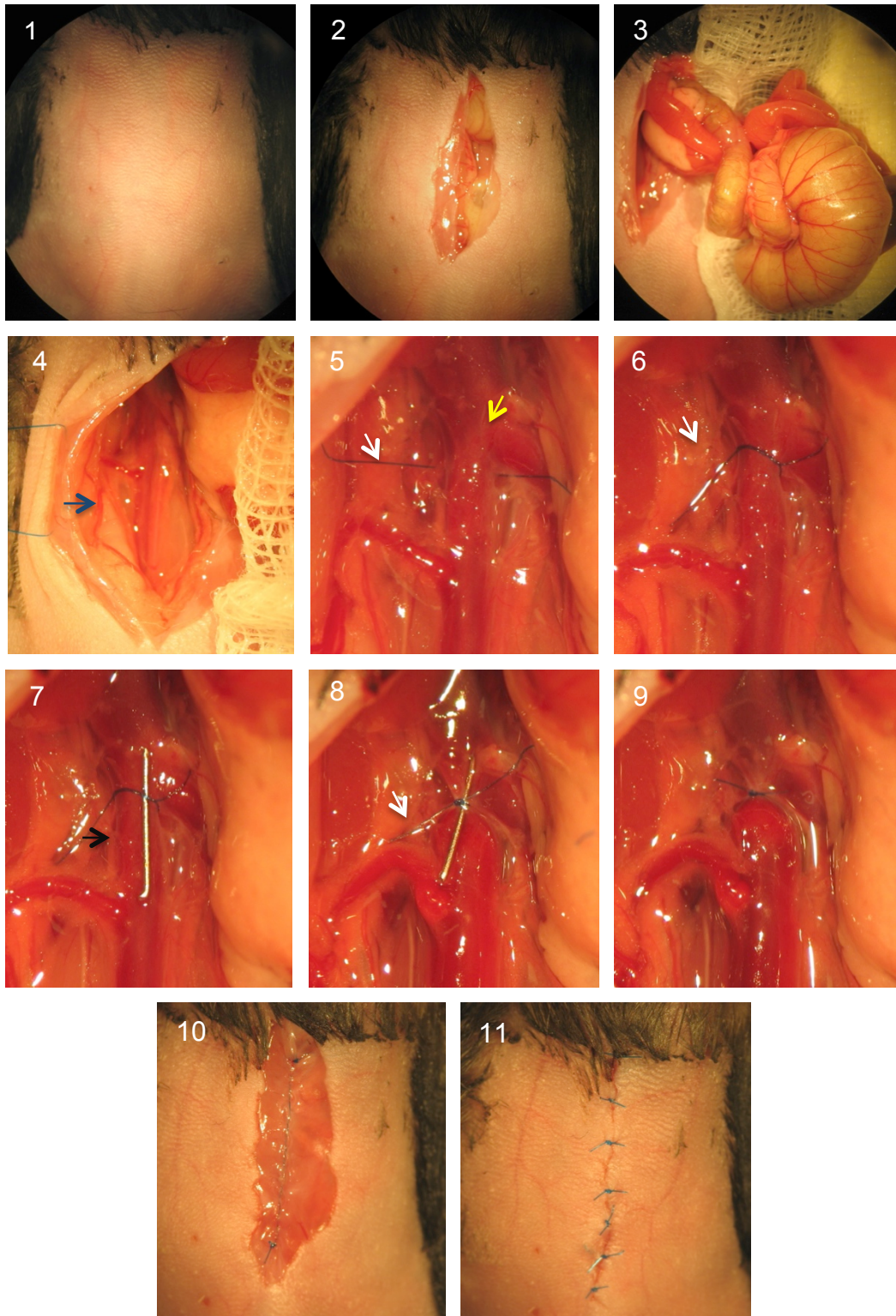
Der Hautschnitt erstreckte sich von ca. 0,5 cm caudal des Xiphoids bis zum Nabel. Für die Durchführung der Intravitalmikroskopie wurde der Bauch vom Xiphoid bis zur Beckenregion eröffnet. Anschließend wurden die Bauchmuskulatur und das Peritoneum in der Linea alba durchtrennt.

Auf einen linksseitig des Tieres positionierten Histocage (Tissue-Loc Cassettes, Richard-Allan Scientific, Kalamazoo, USA) wurde ein Stück angefeuchtete, sterile Gaze (Gazin Mullkompresse, Lohmann & Rauscher, Rengsdorf) gelegt. Unter zu Hilfenahme von mit steriler NaCl angefeuchteten Tupfern (Wattestäbchen Bel premium, CMC Consumer Medical Care GmbH, Sontheim / Brenz) wurde das Darmkonvolut schonend extrakorporal auf die Gaze gelagert, in diese eingehüllt und durch regelmäßiges Befeuchten mit steriler, angewärmter Kochsalzlösung vor dem Austrocknen geschützt. Der Blick auf die ventral der Wirbelsäule verlaufenden Vena cava und die abdominale Aorta war nun frei.

Direkt caudal der Mündung der Vena renalis sinistra wurde das umgebende Binde- und Fettgewebe vorsichtig stumpf von der Vena cava gelöst und die Vene mit einer gebogenen Pinzette untertunnelt, wobei höchste Vorsicht beim Trennen von Vena cava caudalis von der unmittelbar anliegenden Aorta abdominalis geboten war. Dann konnte der Bindfaden (Premilene Polypropylen, 8/0, B. Braun, Melsungen) mit einer doppelten Ligatur vorgelegt werden. Ein feiner Draht (Führungsdraht eines humanen Herzkatheters), der als Platzhalter dient, wurde zwischen Vene und Ligatur positioniert, die Ligatur angezogen und ein Sicherungsknoten darauf gesetzt. Nach Entfernen des Platzhalter blieb so ein gewisses Restlumen und somit Restfluss erhalten.

Nach erfolgreicher Ligatur der Vena cava bzw. nach den intravitalmikroskopischen Aufnahmen wurde der Darm zurück in die Bauchhöhle verlagert und die Wunde verschlossen (Prolene Polypropylen, 7-0 metric, Ethicon, Norderstedt).

Mittel der Wahl war die fortlaufende Diagonalnaht (Kirschner Naht) zum Verschluss von Peritoneum und Muskulatur, wohingegen die Haut mit Kopfheften adaptiert wurde.



**Abbildung 9:** OP-Schritte zur Stenosierung der Vena cava caudalis.

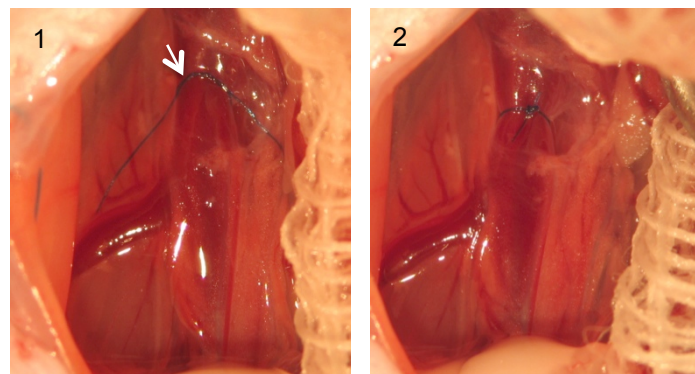
1. Enthaartes und desinfiziertes Operationsfeld; 2. Medianer Hautschnitt mit Eröffnung der Bauchhöhle in

der Linea alba; 3. Darmkonvolut extrakorporal gelagert; 4. Aufsicht auf die Vena cava caudalis (blauer Pfeil); 5. Vena cava caudalis caudal der Vena renalis sinistra (gelber Pfeil) untertunnelt, Faden (weißer Pfeil) für die Ligatur vorgelegt; 6. Doppelter Knoten vorgelegt; 7. Platzhalter (schwarzer Pfeil) zwischen Faden und Vene platziert; 8. Knoten angezogen; 9. Platzhalter entfernt; 10. Naht von Peritoneum und Muskulatur fortlaufend; 11. Hautnaht mit Knopfheften.

### **3.4.2 Sham-Operation**

Die Sham-Operation an Wildtyptieren mit folgender Mikropartikelinjektion wurde durchgeführt, um den Beweis zu erbringen, dass nicht die Manipulation von Gewebe und Vene und dabei eventuell entstehende Läsionen sowie die Applikation tumoröser Mikropartikel per se die Thrombusbildung induziert, sondern die Flussreduktion essentiell für die Thromboseinitiation ist.

Im Falle der Sham-Operation wurde die oben genannte Operationsmethode bis zum Schritt der Untertunnelung der Vena cava caudalis und dem platzieren des Bindfadens identisch durchgeführt. Der Bindfaden wurde dann allerdings nur soweit angezogen, dass er sich der Adventitia direkt anschmiegte, das Gefäß aber nicht einengte.



**Abbildung 10:** OP-Schritte der Sham-Operation.

1. Vena cava untertunnelt und Faden (weißer Pfeil) mit doppeltem Knoten vorgelegt; 2. Ligatur gelegt, so dass Vena cava nur geringgradig eingeschnürt wird.

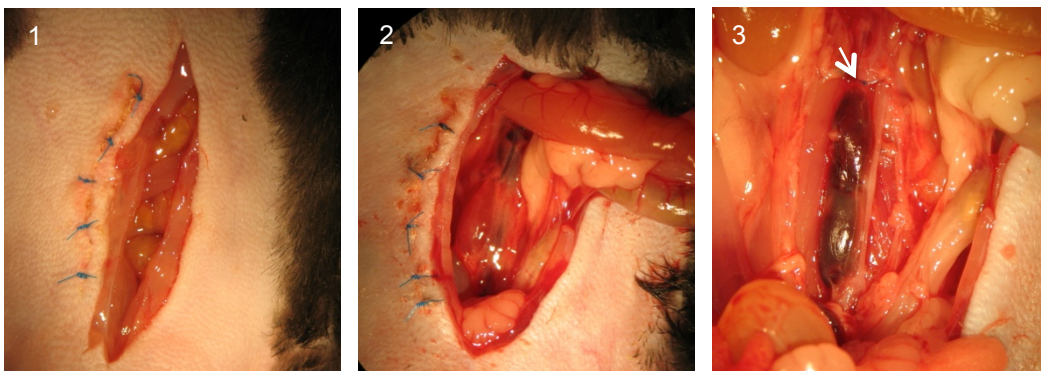
### **3.5 Entnahme der Vena cava caudalis**

Im chronischen Versuch wurden die erneut narkotisierten Tiere 48 h nach Stenosierung der Vena cava euthanasiert, um das Gefäß auf Entstehung eines ve-

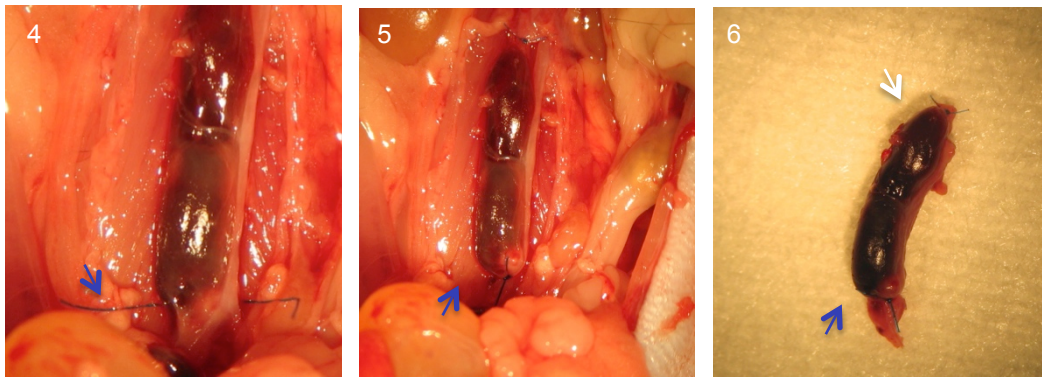
nösen Thrombus makroskopisch untersuchen zu können. Hatte sich ein Thrombus gebildet, konnte dieser entnommen, gewogen und für die weitere histologische Untersuchung aufbereitet werden.

### **3.5.1 Entnahmetechnik**

Parallel zur bereits vorhandenen Nahtlinien wurde die Haut des narkotisierten Tieres sowie Muskulatur und Peritoneum mit einer spitzen Schere durchtrennt und der Darm mit zwei angefeuchteten Wattestäbchen extrakorporal verlagert. Im Hinblick auf die Vena cava caudalis ließ sich makroskopisch beurteilt, ob sich ein Thrombus entwickelt hatte. Im weiteren Vorgehen befeuchtete man die Haut über dem Brustkorb mit Sprühalkohol und durchtrennte sie über dem Sternum. Anschließend inzidierte man die Vena cava cranial der Ligaturstelle, sodass das Blut bei dem folgenden Spülvorgang aus der Zirkulation austreten konnte. Eine 5 ml Spritze (B. Braun, Melsungen) mit steriler NaCl wurde senkrecht im zweiten Interkostalraum für die intrakardiale Punktion eingeführt. War nach leichter Aspiration Blut im Konus sichtbar spülte man das Gefäßsystem mit dem gesamten Volumen von 5 ml. Sobald das Tier entblutet war, konnte die Vene mit der Aorta abdominalis stumpf vom umgebenden Gewebe separiert werden. Um eine Dislokation des Thrombus bei der weiteren Behandlung zu verhindern, wurde eine Ligatur (Prolene Polypropylen, 7-0 metric, Ethicon, Norderstedt) in Höhe der Zuflüsse der Venae iliacae gelegt. Im Folgenden konnte die Vene mit der Federschere vollständig vom umgebenden Gewebe abgetrennt werden.







**Abbildung 11:** OP-Schritte zur Entnahme der Vena cava caudalis.

1. Paramediane Eröffnung der Bauchhöhle; 2. Darmkonvolut extrakorporal gelagert; 3. Aufsicht auf die thrombosierte Vena cava (weißer Pfeil = kraniale Ligatur); 4. Faden für die kaudale Ligatur (blauer Pfeil) vorgelegt; 5. Kaudale Ligatur angezogen; 6. Thrombus entnommen.

### **3.5.2 Gewichtsbestimmung**

48 h nach Ligatur wurden die Tiere nach oben beschriebenem Regime (Abs. 3.5.1) entblutet, das Gefäß entnommen und gewogen. Um sich bei der Auswertung objektiv auf das Thrombusnettogewicht beziehen zu können, wurde eine Versuchsgruppe mit  $n = 7$  C57Bl/6J Tieren herangezogen, um das Leergewicht der Vena cava caudalis zu bestimmen. Dabei wurden die Tiere direkt nach der Stenoseoperation entblutet, die kaudale Hohlvene einschließlich Aorta abdominalis, welche nicht von der Vene abpräpariert wurde und den beiden Ligaturen auf das genormte Filterpapier der Größe 0,5 x 0,3 cm überführt und gewogen (AE 260 DeltaRange, Mettler, Giesen). Der Mittelwert der Leergewichte aller Tiere dieser Versuchsgruppe wurde als standardisiertes Taragewicht vom Brutogewicht der entnommenen Thromben subtrahiert, um das Thrombusnettogewicht zu ermitteln.

### **3.6 Kardiale Blutentnahme**

Durch die kardiale Punktion konnte im finalen Stadium des Versuchs eine große Menge Blut für die weitere Analyse gewonnen werden.

Dem Vorgehen der transkardialen Perfusion folgend, wurde die Haut der sich in Rückenlage, in tiefer Narkose befindlichen Maus über dem Brustkorb mit

Sprühalkohol desinfiziert und über dem Sternum durchtrennt. Die an eine 2 ml Spritze (B. Braun, Melsungen) aufgesteckte 30 G Kanüle (BD Microlance 3, BD, Drogheda, Irland) wurde senkrecht im zweiten Interkostalraum eingeführt und das Blut langsam, durch leichte Aspiration entnommen. In der Spritze waren je 100 µl einer 0,106 molaren Natriumcitrat als Antikoagulanzen vorgelegt.

#### **4. ANTIKÖRPER- / INHIBITORANWENDUNG**

##### **4.1 Injektionsverfahren**

Antikörper und Inhibitoren wurden via Schwanzveneninjektion (Abs. 2.4) injiziert.

##### **4.2 Zelldepletion**

Unter Depletion versteht man Allgemeinlich die Reduktion körpereigener Stoffe. In dieser Arbeit erfolgte die Zelldepletion pharmakologisch, durch i.v. Applikation spezifischer Antikörper, die bestimmte Zellpopulationen binden und aus der Blutbahn eliminieren.

###### **4.2.1 Depletion der Thrombozyten**

Ziel der Depletionsversuche von Thrombozyten war es, Informationen über die Bedeutung von Thrombozyten für die Mikropartikel-induzierte Thrombose zu gewinnen.

Als plättchendepletierender Antikörper kam ein gegen den Oberflächenrezeptor GPIIb/IIIa (rat anti-mouse GPIIb/IIIa, Emfret analytics GmbH & Co. KG, Eibelstadt) gerichtetes, aus dem Blut immunisierter Ratten gewonnenes Immunglobulin zum Einsatz<sup>151</sup>.

In einer Konzentration von 2 mg/kg Körpergewicht wurde die entsprechende Menge Antikörper, verdünnt auf 200 µl Lösung mit NaCl, 30 min nach Beendigung der stenosierenden Operation per Schwanzveneninjektion appliziert.



Im Zuge der Entnahme der Vena cava caudalis 48 h nach Stenosierung konnte aus dem transkardial gewonnen Blut ein Blutbild an einem hämatologischen Analysegerät (Sysmex XE-5000, Sysmex, Norderstedt) erstellt und die Thrombozytopenie bestätigt werden.

Als Kontrolle zur Thrombozytendepletion diente ein Isotyp (rat IgG, Emfret analytics, Eibelstadt)<sup>151</sup>, der nach dem selben Applikationsregime in einer Konzentration von 2 mg/kg Körpergewicht injiziert wurde.

#### **4.2.2 Depletion der Neutrophilen**

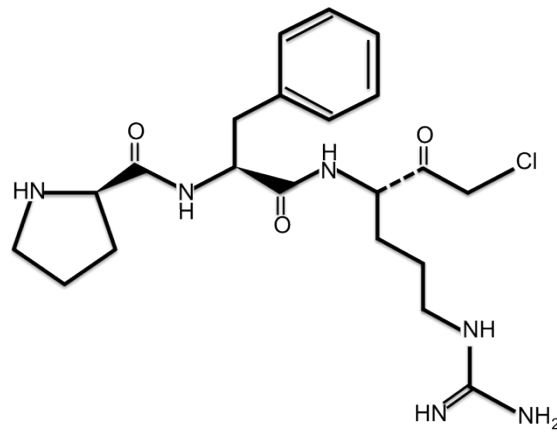
Im Falle der Neutrophilendepletion kam ein spezifisch gegen das Protein Ly6-G gerichteter Antikörper zum Einsatz (purified rat anti-mouse Ly6-G, Klon 1A8, BD Pharmingen, Heidelberg). Dieses Protein wird vorwiegend auf reifen Granulozyten exprimiert. Vorteil dieses Antikörpers ist, dass er Ly6-C positive Zellen (Neutrophile, dendritische Zellen, Subpopulationen von Lymphozyten und Monozyten) unangetastet lässt, also spezifisch neutrophile Granulozyten depletiert<sup>152</sup>.

Bei der ersten Injektion wurden 12 h vor der Ligatur 50 µg Antikörper, verdünnt mit steriler NaCl auf 200 µl Lösung, i.v. appliziert. Eine zweite Injektion von 25 µg Antikörper ebenso verdünnt erfolgte 24 h nach der Ligatur.

Im Zuge der Entnahme der Vena cava caudalis 48 h nach Stenosierung konnte aus dem transkardial gewonnen Blut ein Blutbild an einem hämatologischen Analysegerät erstellt und die Granulozytopenie bestätigt werden.

Das gleiche Injektionsprotokoll lag auch der Isotypkontrolle (rat IgG2b kappa Isotyp, 1 mg/ml, eBioscience, Frankfurt) zu Grunde.

#### **4.3 PCK ((H-D-Pro-Phe-Arg-chloromethylketone)**



**Abbildung 12:** Strukturformel von PCK.

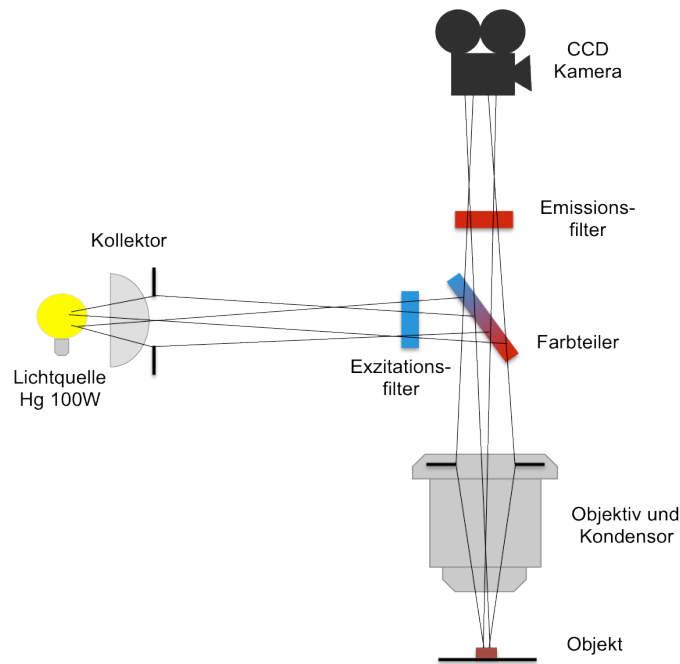
Durch Inhibition des FXII (H-D-Pro-Phe-Arg-chloromethylketone, Bachem AG, Bubendorf) wurde getestet, ob dem intrinsischen Weg der Koagulationskaskade eine merkliche Bedeutung für die Mikropartikel-induzierte Thrombogenese zukommt. Dazu wurde der Inhibitor PCK i.v. in einer Konzentration von 10 mg/kg jeweils direkt vor Ligatur und dann in 24 stündigem Abstand appliziert. Kontrolltiere erhielten nach dem gleichen Injektionsregime je 200 µl sterile NaCl i.v.

## **5. BILDGEBENDE VERFAHREN**

### **5.1 Intravitalmikroskopie**

#### **5.1.1 Prinzip des Epifluoreszenzmikroskops**

Die Intravitalmikroskopie erlaubt es, zelluläre Vorgänge im physiologischen Milieu in vivo in Echtzeit darzustellen. In den Organismus eingebrachte Fluoreszenzfarbstoffe, die Zellen oder zelluläre Bestandteile markieren, lassen einzelne Strukturen im Fluoreszenz-Auflicht-Mikroskop sichtbar werden. Die Färbung der Zellen kann direkt in vivo, aber auch ex vivo erfolgen. Fluorochrome werden durch Bestrahlung mit und Absorption von kurzwelligem, energiereichem Anregungslicht kurzzeitig in einen elektronisch angeregten Zustand versetzt, fallen jedoch unmittelbar danach durch spontane Lichtemission in einen energieärmeren Zustand zurück. Das abgestrahlte Emissionslicht ist von größerer Wellenlänge und unterscheidet sich damit auch farblich vom Anregungslicht. Dieses Phänomen ist als Fluoreszenz bekannt<sup>153</sup>.



**Abbildung 13:** Darstellung des Strahlengangs im Epifluoreszenzmikroskop.

Der Strahl aus der Lichtquelle wird durch Kollektor und Exzitationsfilter auf einen Farbteller geführt, reflektiert und auf das Objekt gelenkt. Vom Objekt emittierte längerwellige Strahlen gelangen durch den Emissionsfilter in die Kamera.

Aus der Abbildung wird der typische Strahlengang in einem Epifluoreszenzmikroskop ersichtlich. Um das schwache Fluoreszenzlicht, welches von angeregten Fluorochromen emittiert wird, störungsfrei detektieren und somit ein definiertes Farb- bzw. Frequenzspektrum erkennen zu können, sind spezielle Filter in den Strahlengang integriert. Eine starke Lichtquelle emittiert weißes Licht, das durch den Kollektor auf einen Exzitationsfilter, welcher als Anregungsfilter fungiert, gelenkt wird. Dieser „Short Pass“-Filter ist selektiv permeabel für kurzwelliges, energiereiches Licht. Das passierende Licht wird vom Farbteller reflektiert und über das Objektiv auf das zu untersuchende Objekt geleitet. Trifft das kurzwellige Licht nun auf Fluorochrome, geht ein Teil der Energie verloren und längerwelliges Licht wird emittiert. Der Farbteller lässt langwelliges Emissionslicht ungehindert in Richtung Emissionsfilter passieren. Ein weiterer Filter, der Emissions- oder „Long pass“-Filter, ist der Kamera vorgeschaltet und lässt seinerseits nur langwelliges Licht passieren. Er nimmt die Funktion eines Sperrfilters ein, welcher die Strahlungsintensität um eventuell noch vorhandenes, störendes Restanregungslicht bereinigt. Eine Kamera leitete die Aufnahmen direkt an den

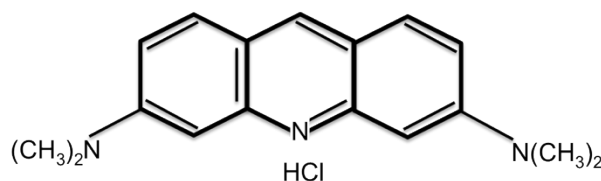
Computer weiter.

Zu beachten ist, dass das Strahlenspektrum der Lichtquelle und verwendete Fluoreszenzfarbstoffe eine Kompatibilität erfordern. Um dies zu gewährleisten wurden in die jeweiligen Mikroskope Filterblöcke eingesetzt, die mit den verwendeten Fluoreszenzfarbstoffen kompatibel sind<sup>11</sup>.

### **5.1.2 Verwendeter Fluoreszenzfarbstoff Acridin-Orange**

Acridin-Orange (3,6-Acridinediamine, N,N,N',N'-tetramethyl-, monohydrochloride, C<sub>17</sub>H<sub>20</sub>ClN<sub>3</sub>) (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland) ist ein oranger Fluoreszenzfarbstoff, der in Folge seiner lipophilen Eigenschaften leicht durch Zellmembranen diffundieren kann. Acridin-Orange akkumuliert in sauren Zellkompartimenten wie zum Beispiel Lysosomen, Endosomen und dem Golgi-Apparat und interkaliert mit nukleärer DNA und RNA. In die Vaskulatur eingebracht dient er der Färbung kernhaltiger Zellen, den Leukozyten<sup>154</sup>. An dsDNA gebundene Farbstoffmoleküle emittieren bei Anregung mit Licht einer Wellenlänge von 495 nm grüne Fluoreszenz, wobei das Emissionsmaximum bei etwa 530 nm liegt.

Für die Intravitalmikroskopie wurden jeweils 0,05 ml Acridin-Orange in einer Konzentration von 0,05 % i.v. appliziert.



**Abbildung 14:** Strukturformel von Acridin-Orange.

### **5.1.3 Durchführung der Intravitalmikroskopie**

Intravitalmikroskopische Untersuchungen wurden mit dem Olympus Cell<sup>^</sup>R System durchgeführt. Als Lichtquelle diente ein Multifunktions-Beleuchtungssystem

MT20 (Olympus, Hamburg) mit Xenon-Lampe. Alle Aufnahmen wurden mit einem 20x Immersionsobjektiv (Olympus, Hamburg) des Mikroskops (BX51WI, Olympus, Hamburg) gefertigt. Das Emissionssignal wurde über eine CCD-Kamera (ORCA-ER, Hamamatsu, Herrsching am Ammersee) an einen Computer gesendet. Die zu Grunde liegende Software war das Cell<sup>^</sup>R-Programm, mit dem die gesamte Erfassung, Dokumentation und Bearbeitung erfolgte.

Um die Flussgeschwindigkeit des Blutes prä- und poststenotisch messen zu können, wurden intravitalmikroskopische Untersuchungen jeweils direkt vor sowie nach Platzierung der Ligatur durchgeführt. Die Vena cava caudalis wurde zu diesem Zweck im Bereich der Mündung der Vena renalis sinistra bis zur Bifurkation der Venae iliacae communes von aufgelagertem Fett- und Bindegewebe freipräpariert. Sodann wurde der Ligaturfaden lose vorgelegt.

Zusätzlich wurde bei jedem Tier ein Jugulariskatheter gelegt, um Acridin-Orange, das verwendete Fluorochrom, applizieren zu können. Sobald die Präparation beendet war konnte die Maus unter dem Epifluoreszenzmikroskop platziert und die Aufnahmen mit 200facher Vergrößerung unter steter Flüssigkeitsimmersion mit steriler, körperwarmer NaCl gemacht werden. Für die Bestimmung der Flussgeschwindigkeit prä- und poststenotisch wurde ein Aufnahme Fenster möglichst weit caudal gewählt. Ungestört durch eventuelle Verwirbelungen wegen Einmündung der Gonadenvene im Bereich direkt caudal der Ligatur wurden jeweils zwei Aufnahmeserien zu je 50 Einzelbildern mit einer Belichtungszeit von 20 ms gefertigt. Daraus entstand ein Film von ca. 5 sec Länge.

#### **5.1.4 Auswertung - Flussgeschwindigkeitsbestimmung**

Die Flussgeschwindigkeit prä- und poststenotisch wurde bestimmt, um im Zuge der Standardisierung des Modells den prozentualen Anteil der Flussreduktion nach Ligatur eruieren zu können.

Zu diesem Zweck wurden die mit dem Programm Cell<sup>^</sup>R erstellten Filme in die Software ImageJ (Freeware) überführt, mit der die Auswertung erfolgte. Pro

Tier und Aufnahme wurden 6-8 Zellen in der sogenannten Frame-to-Frame Methode über mehrere Einzelbilder verfolgt und aus den Einzelwerten die mittlere Flussgeschwindigkeit einer Zelle errechnet. Aus den 6-8 ausgewerteten Zellen wurde schließlich die mittlere Flussgeschwindigkeit je Aufnahme und Tier gebildet und die prozentuale Flussreduktion aus dem Quotienten der Flussgeschwindigkeit post- und prästenotisch errechnet.

## **5.2 Computertomographie**

### **5.2.1 Prinzip der Computertomographie**

Die Computertomographie ist ein Bildgebungsverfahren in der Medizin, um überlagerungsfreie Schichtbilder zu schaffen.

Um den auf dem Patiententisch liegenden Patienten rotiert das sogenannte Gantry, die Scaneinheit, welche die Röntgenquelle sowie den Detektor trägt. Die von der Röntgenquelle emittierten Röntgenstrahlen treffen, nachdem sie den Patienten durchstrahlt haben und auf dem Weg durch das Gewebe abgeschwächt wurden, auf den Detektor, der aus einem strahlenempfindlichen Material besteht. Der Detektor absorbiert die einfallenden Röntgenstrahlen und wandelt sie in sichtbares Licht um, welches wiederum auf eine Photodiode trifft, die das Licht in elektrischen Strom umwandelt. Aus dem Stromimpuls wird ein digitales Signal erstellt. Letztlich entsteht ein zweidimensionales Schnittbild durch komplexe mathematische Berechnungen am Computer. Weil in der Computertomographie ein Schnittbild aus gleich großen Volumenelementen, den Voxeln, besteht, denen in Abhängigkeit des Röntgen-Absorptionskoeffizienten je ein Grauwert zugeordnet wird, stellt sich ein CT in verschiedenen Grautönen dar. Durch die Rotation des Gantrys um den Patienten wird ein Gewebe aus vielen Richtungen durchstrahlt. Erst aus der Summe der Absorptionsprofile kann dann die Volumenstruktur rekonstruiert werden<sup>155</sup>.

### **5.2.2 Durchführung der Computertomographie**

Für die schmerzfreie CT-Untersuchung wurden Mäuse 48 h nach der Induktion

der TVT verwendet und mit Isofluran anästhesiert. Als Kontrastmittel kam das kolloidale eXIA 160 (eXIA 160-XL, Binitio Biomedical Inc., Ottawa, CAN) zum Einsatz, das in Folge seines hohen Jodgehalts auch bei geringem Injektionsvolumen von 100 µl/Maus einen deutlichen Kontrast zwischen Blut und Gewebe schafft. Es wurde i.v. appliziert.

Die CT-Untersuchung wurde mit einem Inveon PET / CT (Siemens, München) durchgeführt. Folgende Geräteeinstellungen wurden gewählt: Belichtungszeit 400 ms, Röntgenröhrenspannung 80 kV, Anodenstrom 400 µA.

### **5.3 Sonographie**

#### **5.3.1 Prinzip des Sonographie**

Als Ultraschall bezeichnet man Schall im Bereich von 20 kHz bis 100 MHz. Im medizinischen Bereich kommen Geräte zum Einsatz, die Schallwellen erzeugen, indem ein kurzer elektrischer Impuls an die im Schallkopf angeordneten piezoelektrische Kristalle angelegt wird, die den Ultraschallimpuls generieren. Diese Kristalle fungieren gleichfalls als Empfänger der reflektierten Schallwellen. Die Schwingungen breiten sich im Gewebe in Abhängigkeit von Gewebedichte und Frequenz und Wellenlänge unterschiedlich schnell aus. Am Übergang von Geweben unterschiedlicher Dichte ändert sich der Schallwellenwiderstand, was auch als Impedanzsprung bezeichnet wird. An diesen Grenzflächen werden die Schallwellen teils reflektiert, teils dringen sie weiter ins Gewebe ein (Transmission) oder werden gebrochen und setzen ihren Weg fort. Reflektierte Schallwellen, das sogenannte Echo, die wieder auf die Sonde treffen, erzeugen ihrerseits ein elektrisches Signal. Aus der Zeitdifferenz, die zwischen Aussenden der Schallwellen und Empfang der Echos liegt und der Geschwindigkeit des ausgesendeten Schalls kann die Lage der geschallten Strukturen berechnet werden.

Von den verschiedenen Darstellungsmodi wurde für die sonographische Beurteilung der Entstehungsdynamik venöser Thromben in der Vena cava caudalis der Brightness-Mode (kurz B-Mode) gewählt. In diesem Modus werden die Amplituden der empfangenen Schallwellen als Lichtpunkte verschiedener Graustufen auf einem Monitor dargestellt. Dabei korreliert die Helligkeit mit der

Intensität der Echos. Es entsteht ein 2D-Bild, an dem Längen- und Flächenberechnungen durchgeführt werden können<sup>156</sup>.

### **5.3.2 Ablauf der sonographischen Untersuchungen**

Das transportable Ultraschallgerät MyLab™ One der Firma Esaote (Esaote Biomedica Deutschland GmbH, Köln) ist Grundlage der sonographischen Untersuchungen. Als Sonde wurde ein Linearschallkopf vom Typ SL 3116 verwendet, dessen Sendefrequenz zwischen 14-22 MHz variabel ist. Für die Darstellung der feinen anatomischen Strukturen der Maus wurde die Frequenz 22 MHz gewählt.

Für die nicht invasive und nicht schmerzhaft Ultraschalluntersuchung wurden die Tiere mit einem 3 %igen Isofluran-Sauerstoff-Gemisch in Narkose gelegt. Nach dem Auftragen von Augensalbe und dem Scheren der rechten Bauch- und Brustwand, wurden die Tiere in links-lateraler Lagerung auf einer Wärmepatte positioniert und die Schnauze in einer auf dieser Wärmematte befestigten Kopfkammer platziert. Über die Kopfkammer war die konstante Zufuhr von mit 1,5 % Isofluran angereichertem Sauerstoff möglich um die Narkose aufrecht zu erhalten.

Um eine gute Adaptation des Schallkopfes zu gewährleisten, wurde großzügig Ultraschallgel (Sonogel, Sonogel Vertriebs GmbH, Bad Camberg) aufgetragen, bevor mit der Schalluntersuchung begonnen wurde.

Über einen Zeitraum von 3 h wurde in halbstündigem Abstand ein Kurzfilm der Vena cava caudalis im prästenotischen Bereich im Längsschnitt erstellt.

### **5.3.3 Auswertung**

Die erstellten Filme wurden mit dem Programm MyLabDesk von Esaote bearbeitet. Aus den Filmen konnten entsprechende Einzelbilder generiert werden, an denen die Längenmessung des sichtbaren Thrombusmaterials erfolgte. Zu diesem Zweck steht dem Anwender eine Messfunktion zur Verfügung.

Für die Flächenberechnung wurden die Bilder mit dem Programm Image J ge-



öffnet und zunächst eine Skalierung auf die richtige Maßeinheit vorgenommen. Anschließend konnte das Thrombusmaterial manuell, unter Einsatz des Freihandtools, umfahren und die Flächenmaße ermittelt werden.

## **6. IMMUNHISTOLOGIE**

### **6.1 Anfertigen histologischer Schnitte - Kryotom**

Die Vena cava caudalis wurde direkt nach der Entnahme, makroskopischen Beurteilung und dem Wiegen in ein aufgeschnittenes Stück Schlauch überführt und mit Einbettmedium (Tissue-Tek O.C.T. Compound, Sakura, Alphen aan den Rijn, NL) überlagert. Sogleich wurde sie in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80° C gefrierkonserviert.

Zum Anfertigen immunhistologischer Schnitte wurde der tiefgefrorene Thrombus in einem, auf -25° C vorgekühlten Kryostat (CM 1850, Leica, Nussloch) mit Hilfe von Tissue Tek auf einem Haltestempel fixiert, um serielle Schnitte anfertigen zu können. Die Dicke der Schnitte betrug je 5 µm. Sie wurden auf beschichtete Objektträger (Superfrost Plus, Menzel, Braunschweig) übertragen und bei -20° C bis zur immunhistologischen Färbung gelagert.

### **6.2 Färbung**

Antigene werden mit den spezifischen fluoreszierenden Antikörpern nachgewiesen. Die immunhistologische Färbung gibt Aufschluss über Zellverteilung, -quantität und -interaktion.

Da nur der sekundäre Antikörper, der an die Fc-Fraktion des Primärantikörpers bindet, fluoresziert, spricht man von indirekter Immunfärbung. Vorteil ist, dass es durch Bindung mehrerer Sekundärantikörper an einen Primärantikörper zur Signalverstärkung kommt<sup>153</sup>.

### **6.2.1 Allgemeines Färbeprotokoll**

Allen immunhistologischen Färbungen lag nachfolgendes Standardprotokoll zu Grunde<sup>47</sup>.

Um die Schnitte während der Färbeprozedur vor Austrocknung und Lichteinstrahlung zu schützen, wurden sie in eine lichtundurchlässige Kammer gelegt. Zudem wurden sie mit einem Fettstift (Dako Pen, Dako, Hamburg) umfahren, damit aufgetragene Lösungen auf dem Präparat bleiben und nicht verlaufen.

Zunächst wurden die Schnitte für 3 min bei Raumtemperatur in 4 %iger Formalinlösung (Thermo Scientific, Rockford, Illinois, USA) fixiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS (Invitrogen, Darmstadt) + 0,1 % Tween (Tween 20, Sigma-Aldrich, Taufkirchen) wurden unspezifische Bindungen geblockt. Zur Anwendung kam ein anti-mouse CD16/32 Antikörper (affinity purified rat anti-mouse CD16/32, Clone 93, eBioscience, San Diego, Kalifornien, USA) in einer Verdünnung von 1:200 zusammen mit 3 % BSA (Bovine Serum Albumin, PAA Laboratories, Pasching, Österreich) in PBS. Nach einer Inkubationszeit von 30 min wurde die Blockierlösung nur abgeklopft um direkt im Anschluss den Primärantikörper bzw. die Isotypkontrolle aufzutragen. Die Inkubation für eine Stunde wurde durch erneutes Waschen mit PBS + 0,1 % Tween beendet. Sekundärantikörper waren entweder mit den Fluoreszenzfarbstoffen Alexa 488 (grün) oder Alexa 594 (rot) gelabelt. Die Inkubation dauerte eine weitere Stunde. Schließlich wurde mit DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindole, dihydrochloride, Invitrogen, Darmstadt), einem blau fluoreszierenden Reagenz in einer Verdünnung von 1:3000 für 30 Sekunden inkubiert, um die Zellkerne darstellen zu können. Es folgte ein abschließender Waschgang, bevor das Präparat mit 1-2 Tropfen Eindeckmedium (Mounting Medium, DAKO, Hamburg) bedeckt wurde, welches sich nach Auflegen eines Deckglases gleichmäßig über dem gefärbten Schnitt verteilte.

Aufnahmen wurden an einem digitalen Mikroskop (Leica DMRB, Firma Leica, Bensheim, Deutschland) gemacht, wobei eine Kamera (AxioCam, Firma Zeiss, Göttingen, Deutschland) die Schnitte abfotografiert und gleichzeitig auf den Computer übertrug.

### 6.2.2 Zellspezifische Färbungen

Die Gesamtzahl der Leukozyten wurde durch die spezifische Bindung eines gegen das Antigen CD45 gerichteten Antikörpers markiert.

|                    | <b>Primärantikörper</b> | <b>Sekundärantikörper</b> |
|--------------------|-------------------------|---------------------------|
| Antigen            | CD45                    |                           |
| Konzentration      | 0,5 mg/ml               | 2 mg/ml                   |
| Verdünnung         | 1:1000                  | 1:200                     |
| Spezies            | rat                     | donkey anti-rat           |
| Klon / Fluorochrom | 30-F11                  | Alexa 594                 |
| Anbieter           | eBioscience             | Invitrogen                |

**Tabelle 3:** Antikörper zur immunhistologischen Leukozytenfärbung.

Neutrophile Granulozyten wurden mit Hilfe eines spezifisch gegen das granulozytäre Antigen Ly6-G, welches nur auf Neutrophilen nachweisbar ist, gefärbt<sup>152</sup>. Die Färbung folgte dem gezeigten Standardprotokoll.

|                    | <b>Primärantikörper</b> | <b>Sekundärantikörper</b> |
|--------------------|-------------------------|---------------------------|
| Antigen            | Ly6-G                   |                           |
| Konzentration      | 0,2 mg/ml               | 2 mg/ml                   |
| Verdünnung         | 1:500                   | 1:200                     |
| Spezies            | rat                     | donkey anti-rat           |
| Klon / Fluorochrom | 1A8                     | Alexa 594                 |
| Anbieter           | BD Pharmingen           | Invitrogen                |

**Tabelle 4:** Antikörper zur immunhistologischen Neutrophilenfärbung.

Zur Darstellung von Thrombozyten im immunhistologischen Präparat wurde ein gegen CD41 gerichteter Antikörper verwendet. Das Färbeprozedere entsprach dem beschriebenen Protokoll, wobei die Zellen vor dem Blocken noch mit TritonX-100 (Sigma-Aldrich, Taufkirchen) permeabilisiert und anschließend mit PBS + 0,1 % Tween gewaschen wurden.

|                    | <b>Primärantikörper</b> | <b>Sekundärantikörper</b> |
|--------------------|-------------------------|---------------------------|
| Antigen            | CD41                    |                           |
| Konzentration      | 0,2 mg/ml               | 2 mg/ml                   |
| Verdünnung         | 1:25                    | 1:200                     |
| Spezies            | rat                     | donkey anti-rat           |
| Klon / Fluorochrom | MWReg 30                | Alexa 594                 |
| Anbieter           | BD Pharmingen           | Invitrogen                |

**Tabelle 5:** Antikörper zur immunhistologischen Thrombozyenfärbung.

Die Blutgerinnung gipfelt in der Bildung von quervernetztem Fibrin. Die Färbung auf Fibrinogen sollte dieses Netz sichtbar machen, denn der verwendete Antikörper reagiert kreuz mit Fibrin. Abweichend zum Standardprotokoll wurde nur mit 2 % Glycin (Roth, Karlsruhe) und Fc-Block (1:200) geblockt.

|                    | <b>Primärantikörper</b> | <b>Sekundärantikörper</b> |
|--------------------|-------------------------|---------------------------|
| Antigen            | Fibrinogen              |                           |
| Konzentration      | 6mg/ml                  | 2mg/ml                    |
| Verdünnung         | 1:300                   | 1:200                     |
| Spezies            | rabbit                  | donkey anti-rabbit        |
| Klon / Fluorochrom | A0080                   | Alexa 594                 |
| Anbieter           | DAKO                    | Invitrogen                |

**Tabelle 6:** Antikörper zur immunhistologischen Fibrinogenfärbung.

## **7. DOKUMENTATION**

Um die Nachvollziehbarkeit der Versuche gewährleisten zu können, wurde für jedes Tier ein schriftliches Protokoll erstellt, gemäß den Vorgaben des Genehmigungsbescheides der Regierung von Oberbayern zu dem entsprechenden Tierversuchsvorhaben. Zudem wurden alle Daten in Form einer, mit einem Tabellenkalkulationsprogramm erstellten, elektronischen Datenbank gespeichert. Dokumentiert wurden Operationsdatum, Herkunft der Tiere, Tiernummer und Stamm, Geburtsdatum und Alter in Wochen, Geschlecht, Körpergewicht sowie Menge der verabreichten Narkose, Mikropartikeltyp, makroskopisches Vorhandensein von Thromben und deren Gewicht. Falls zutreffend, wurden die Menge

der verabreichten Substanzen (Antikörper etc.) und die Applikationsweise festgehalten. Im Falle bildgebender Maßnahmen wurde der genaue Zeitverlauf und die gewonnenen Erkenntnisse stichpunktartig niedergeschrieben.

## **8. VERSUCHSPLANUNG**

### **8.1 Tierzahl**

Insgesamt forderten die Versuche 166 Tiere. Während vor allem die genetisch manipulierten Tiere aus eigener Zucht stammten, konnten die Mäuse des C57Bl/6J Wildtypstammes käuflich erworben werden. Im Zuge der Standardisierung des venösen Stenosemodells wurden 33 Tiere verwendet. Die Flussgeschwindigkeit wurde an 10 Tieren bestimmt, wovon 5 Tiere für die Erhebung der Thrombusinzidenz herangezogen wurden. Weitere 7 Tiere dienten der Ermittlung des Leergewichts. Schließlich wurde die Thrombusinzidenz an 21 Tieren erhoben. Die Auswirkung der verschiedenen Mikropartikel-Typen - Blut-, FG- und L3.6pl-Mikropartikel - wurde jeweils an 8 Tieren bewertet, wobei an weiteren 8 Tieren, welche L3.6pl-Mikropartikel erhielten, eine Sham-Operation durchgeführt wurde, um manipulative Gefäßschäden als Trigger für die Thrombusbildung ausschließen zu können. Von den genetisch manipulierten Mauslinien GPIb/IL-4R und  $TF^{fl/fl}$  LysM Cre<sup>+</sup> kamen jeweils 4 Tiere je Gruppe zum Einsatz, von den SELP<sup>-/-</sup> wurden insgesamt 9 Tiere in den Versuch genommen. Weitere Versuche zur Untersuchung der Bedeutung von Thrombozyten bzw. Neutrophilen durch Zelldepletion sowie der Rolle des intrinsischen Gerinnungsweges durch Inhibition von FXII wurden ebenfalls an jeweils 4 Tieren pro Gruppe durchgeführt. Mikropartikel, welche vor Injektion mit einem anti-TF-Antikörper behandelt wurden, fanden an 5 Tieren Anwendung. Schließlich wurden 12 Tiere für bildgebende Maßnahmen herangezogen, 9 für Ultraschall-, 3 für CT-Untersuchungen.

Für die Auswertung wurden nur Tiere herangezogen, bei denen keine oder nur eine geringgradige Blutung aus dem umgebenden Fett- und Bindegewebe während der Operation aufgetreten war. Bei Blutungen wurden die Tiere aus den Versuchsgruppen ausgeschlossen. Dies war bei 6 Mäusen der Fall. Zudem

konnten 15 Tiere nicht in die Auswertung einfließen, da sie während der 48 h aufgrund von schlechtem Allgemeinbefinden, bewertet in Anlehnung an das Scoresystem, euthanasiert wurden.

Die Durchführung des Tierversuchsvorhabens erfolgte mit Genehmigung der Regierung von Oberbayern.

## **8.2 Versuchsgruppen**

Für die Standardisierung der venösen Thrombose im Stenosemodell wurden folgende Tiere herangezogen:

| Parameter            | Stamm    | Anzahl & Geschlecht | Alter (Wo) | Gewicht (g) |
|----------------------|----------|---------------------|------------|-------------|
| Flussgeschwindigkeit | C57Bl/6J | 4m, 6w              | 11-24      | 21,5-32,1   |
| Leergewicht          | C57Bl/6J | 0m, 7w              | 12-24      | 22,1-25,2   |
| Thrombusinzidenz     | C57Bl/6J | 17m, 4w             | 12-25      | 24,8-32,1   |

**Tabelle 7:** Tiere für die Standardisierung des venösen Stenosemodells.

Um den Effekt der verschiedenen Mikropartikeltypen evaluieren zu können wurden folgende Tiere operiert:

| Mikro-partikel | Stamm    | Eingriff | Anzahl & Geschlecht | Alter (Wo) | Gewicht (g) |
|----------------|----------|----------|---------------------|------------|-------------|
| Blut-MP        | C57Bl/6J | Ligatur  | 5m, 3w              | 11-30      | 21,7-27,1   |
| FG             | C57Bl/6J | Ligatur  | 4m, 4w              | 10-34      | 23,3-27,9   |
| L3.6pl         | C57Bl/6J | Ligatur  | 5m, 3w              | 11-25      | 19,3-28,8   |
| L3.6pl         | C57Bl/6J | Sham-OP  | 4m, 4w              | 10-30      | 18,2-31,1   |

**Tabelle 8:** Tiere für die Mikropartikel-getriggerte venöse Stenose.

Nachfolgend aufgeführte Tiere genetisch manipulierter Stämme wurden operiert, um den Effekt spezifischer Protein im Rahmen der Mikropartikel-getriggerten venöse Stenose zu beurteilen.

| Stamm   | Mikropartikel | Anzahl & Geschlecht | Alter (Wo) | Gewicht (g) |
|---|---------------|---------------------|------------|-------------|
| B6.129s7-Selp (tm1Bay)/J                                | Blut-MP       | 3m, 2w              | 11-16      | 22,1-28,8   |
| Kontrolltiere C57Bl/6J                                  | Blut-MP       | 3m, 2w              | 10-30      | 21,0-26,4   |
| B6.129s7-Selp (tm1Bay)/J                                | L3.6pl        | 2m, 2w              | 16-31      | 23,7-28,3   |
| Kontrolltiere C57Bl/6J                                  | L3.6pl        | 2m, 2w              | 9-34       | 20,2-30,0   |
| GPIb/IL-4R  | L3.6pl        | 3m, 1w              | 21-24      | 20,4-29,1   |
| Kontrolltiere C57Bl/6J                                  | L3.6pl        | 2m, 2w              | 9-16       | 20,1-29,8   |
| TF <sup>fl/fl</sup> LysM Cre <sup>+</sup>               | L3.6pl        | 1m, 3w              | 12-15      | 17,4-18,8   |
| Kontrolltiere TF <sup>fl/fl</sup> LysM Cre <sup>-</sup> | L3.6pl        | 1m, 3w              | 12-34      | 19,4-25,8   |

**Tabelle 9:** Tiere der Knockout-Stämme für die venöse Stenose.

Weiterhin sollte der Verlauf der Mikropartikel-getriggerten venösen Stenose unter Einsatz spezifischer Antikörper und Inhibitoren getestet werden, um verschiedene Mechanismen und zelluläre Effekte ausschalten zu können. Dazu wurden folgende Tiere thrombozytendepletiert:

| Antikörper                       | Stamm    | Mikropartikel | Anzahl & Geschlecht | Alter (Wo) | Gewicht (g) |
|----------------------------------|----------|---------------|---------------------|------------|-------------|
| rat anti-mouse GPIb <sub>α</sub> | C57Bl/6J | L3.6pl        | 2m, 2w              | 12-22      | 21,9-27,9   |
| rat IgG                          | C57Bl/6J | L3.6pl        | 2m, 2w              | 14-15      | 22,2-28,7   |

**Tabelle 10:** Tiere für die Thrombozytendepletion.

Für die Neutrophilendepletion wurden folgende Tiere verwendet:

| Antikörper                     | Stamm    | Mikro-partikel | Anzahl & Geschlecht | Alter (Wo) | Gewicht (g) |
|--------------------------------|----------|----------------|---------------------|------------|-------------|
| rat anti-mouse Ly-6G, Klon 1A8 | C57Bl/6J | L3.6pl         | 2m, 2w              | 11-16      | 23,7-26,0   |
| rat IgG 2b <sub>k</sub> Isotyp | C57Bl/6J | L3.6pl         | 1m, 3w              | 13-17      | 20,2-25,3   |

**Tabelle 11:** Tiere für die Neutrophilendepletion.

Für die Beurteilung der Rolle des intrinsischen Gerinnungsweges durch Inhibition des FXII wurden folgende Tiere verwendet:

| Inhibitor                          | Stamm    | Mikro-partikel | Anzahl & Geschlecht | Alter (Wo) | Gewicht (g) |
|------------------------------------|----------|----------------|---------------------|------------|-------------|
| H-D-Pro-Phe-Arg-chloromethylketone | C57Bl/6J | L3.6pl         | 2m, 2w              | 10-17      | 19,8-26,3   |
| Kontrolle: NaCl i.v.               | C57Bl/6J | L3.6pl         | 2m, 2w              | 9-11       | 19,4-27,0   |

**Tabelle 12:** Tiere für die Untersuchungen zur Rolle des intrinsischen Systems.

Für die Beurteilung der Rolle des mikropartikulären TF kamen folgende Tiere zu Einsatz:

| Antikörper                                       | Stamm    | Mikro-partikel | Anzahl & Geschlecht | Alter (Wo) | Gewicht (g) |
|--|----------|----------------|---------------------|------------|-------------|
| PE mouse anti-human CD142                        | C57Bl/6J | L3.6pl         | 2m, 3w              | 14-18      | 19,0-26,7   |
| Purified mouse IgG1 <sub>k</sub> Isotype Control | C57Bl/6J | L3.6pl         | 3m, 2w              | 11-17      | 19,9-29,3   |

**Tabelle 13:** Tiere für die Untersuchungen zur Rolle von mikropartikulärem TF.

### **8.3 Bildgebende Maßnahmen**

Computertomographische Untersuchungen zur Bewertung der Thrombusbildung in vivo wurde an drei Tieren durchgeführt:



| Mikro-partikel | Stamm    | Kontrast-mittel | Anzahl & Geschlecht | Alter (Wo) | Gewicht (g) |
|----------------|----------|-----------------|---------------------|------------|-------------|
| Blut-MP        | C57Bl/6J | eXIA 160        | 2w                  | 17         | 20,9-21,2   |
| L3.6pl         | C57Bl/6J | eXIA 160        | 1m                  | 19         | 30,1        |

**Tabelle 14:** Tierzahl für die CT-Untersuchungen.

Untersuchungen zur Kinetik der Mikropartikel-induzierten Thrombogenese wurde mittels Ultraschall durchgeführt. Um die Dynamik der Thrombusbildung nachvollziehen zu können, wurden folgende Tiere verwendet:

| Zeitspanne  | Stamm    | Mikro-partikel | Anzahl & Geschlecht | Alter (Wo) | Gewicht (g) |
|---|----------|----------------|---------------------|------------|-------------|
| 1.-3. h post 1. Injektion                             | C57Bl/6J | L3.6pl         | 1m                  | 12         | 24,1        |
| 4.-6. h post 1. Injektion                             | C57Bl/6J | L3.6pl         | 1m                  | 12         | 23,2        |
| 1.-3. h post 2. Injektion; sofortige Thrombusentnahme | C57Bl/6J | L3.6pl         | 1w                  | 14         | 19,6        |
| 1.-3. h post 2. Injektion, Entnahme nach 48 h         | C57Bl/6J | L3.6pl         | 2m, 1w              | 12-14      | 18,6- 27,1  |
| 1.-3. h post 2. Injektion, Entnahme nach 48 h         | C57Bl/6J | Blut-MP        | 1m, 2w              | 17         | 20,9- 26,1  |

**Tabelle 15:** Tierzahl für die Dynamikbeurteilung durch Ultraschall.

## **9. STATISTISCHE AUSWERTUNG**

Die statistische Auswertung der gewonnenen Ergebnisse erfolgte vorwiegend mit dem Programm SigmaStat 3.5 (Systat Software, Inc, Chicago, USA). Jeweils zwei Gruppen wurden auf einen bestehenden Unterschied hin mit Hilfe des t-Tests bzw. des Mann-Whitney Rangsummentests verglichen. Zunächst führte das Programm einen Test auf Normalverteilung der Daten nach Shapiro-

Wilk sowie einen Test auf die Varianzhomogenität durch. Waren beide Tests erfolgreich, konnte der t-Test angewendet werden. Falls einer der beiden Tests scheiterte griff das Programm automatisch auf den Rangsummentest zurück. Im Falle des Rangsummentests vollführte das Programm bei größeren Fallzahlen ( $n > 10$ ) die asymptotische Testvariante, bei kleinen Fallzahlen ( $n < 10$ ) die exakte Testvariante. Beim t-Test wurde stets die einseitige Testvariante gewählt.

In einem Fall wurden zwei Versuchsgruppen im Hinblick auf das mittlere Thrombusgewicht mit dem Äquivalenztests auf die Gleichheit der Daten verglichen. Die Berechnung folgte den Ausführungen von Steinijans aus dem Manuskript von Schneider<sup>157,158</sup>. Als maximale Effektstärke wurde dabei der Wert von 7 mg angenommen. Dieser Test sollte unter Berücksichtigung einer gewissen Irrtumswahrscheinlichkeit bewerten, ob zwei Werte abhängig von der Effektstärke als gleich interpretiert werden können.

## **V. ERGEBNISSE**

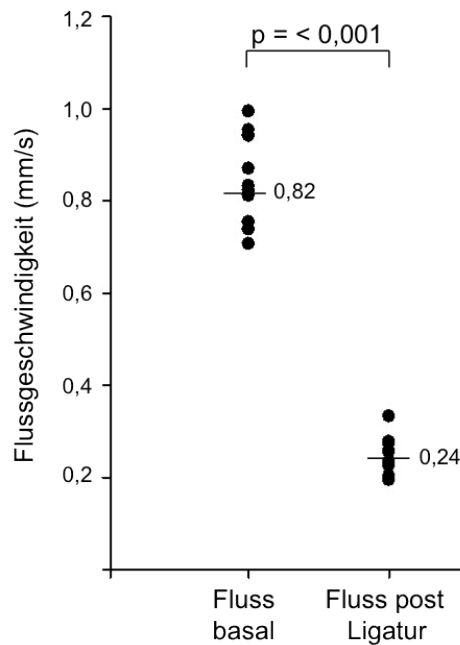
### **1. STANDARDISIERUNG DER VENÖSEN STENOSE IN WILDTYPTIEREN**

In der vorliegenden Arbeit wurde die venöse Thrombose am Mausmodell durch Flussverlangsamung in der Vena cava caudalis induziert. Dadurch kam es bei etwa 60 % der Tiere innerhalb von 48 h zur Bildung eines Thrombus caudal der Stenose. Ziel dieser Arbeit war es zu untersuchen, wie Tumormikropartikel den Prozess der Thrombusbildung beeinflussen. Dafür war eine Standardisierung des Tiermodells notwendig, die im Folgenden weiter beschrieben wird.

#### **1.1 Bestimmung der Flussgeschwindigkeit**

Durch die stenosierende Ligatur an der Vena cava caudalis wurde der venöse Blutfluss stark verlangsamt. Um den Unterschied der Strömungsgeschwindigkeit vor und nach Platzierung der Ligatur beurteilen zu können, wurden in einer Versuchsgruppe von 10 Tieren kernhaltige Zellen mit Acridin-Orange gefärbt, um sie intravitalmikroskopisch visualisierbar zu machen und die Flussgeschwindigkeit berechnen zu können.

Basal betrug die Flussgeschwindigkeit  $0,82 \text{ mm/s} \pm 0,03 \text{ mm/s}$ , nach Stenosierung war sie mit  $0,24 \text{ mm/s} \pm 0,01 \text{ mm/s}$  signifikant verlangsamt ( $p = < 0,001$ ). Dies entspricht einer Reduktion der Flussgeschwindigkeit von 70,3 %.



**Abbildung 15:** Vergleich der Flussgeschwindigkeit vor und nach Stenosierung der Vena cava caudalis (n=10); Querbalken = Mittelwert.

## **1.2 Leergewichtsbestimmung**

Da die venösen Thromben samt umgebender Gefäßwand, den beiden Ligaturfäden sowie der anliegenden Aorta entnommen und tiefgefroren wurden, war es von Nöten, das Leergewicht der umgebenden Strukturen zu bestimmen, um einen Rückschluss auf das Thrombusnettogewicht ziehen zu können. Dazu wurden 7 Tiere direkt nach der stenosierenden Ligatur entblutet und das Gefäß entnommen (Abs. 3.5). Das Gewicht dieser Strukturen von allen Tieren ergab im Mittel das Leergewicht von 5,4 mg, welches als Tara vom Thrombusbruttogewicht subtrahiert wurde.

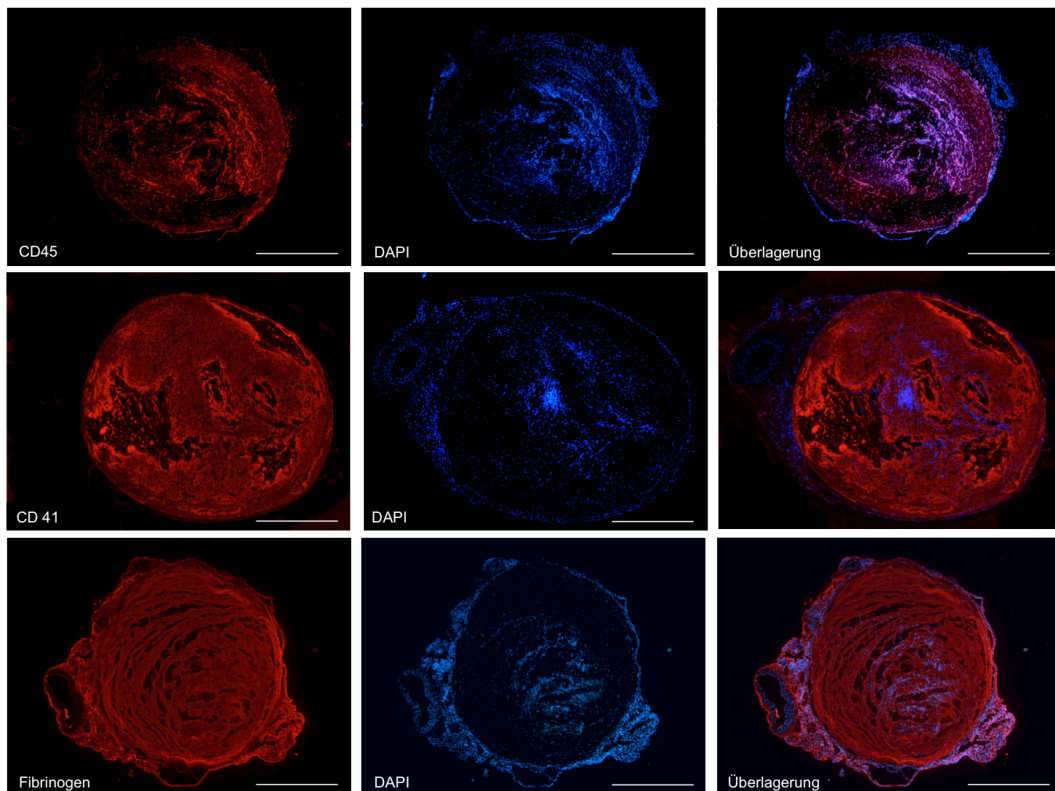
## **1.3 Thrombusinzidenz**

Das makroskopische Vorhandensein oder Fehlen venöser Thromben 48 h nach der stenosierenden Operation wurde zur Quantifizierung der Thromboseneigung als prozentualer Wert angegeben. Ein Thrombus stellte sich als dunkle Masse innerhalb des Gefäßes dar und konnte nach Perfusion der Vaskulatur in



Blut-Mikropartikel i.v. appliziert bekamen, zeigt eine ähnliche Thrombusrate und Gewichtsverteilung. Im Vergleich beider Gruppen mittels Äquivalenztest konnte bewiesen werden, dass eine statistisch signifikante Äquivalenz vorliegt ( $p < 0,05$ ). Das bedeutet, dass im Vergleich das mittlere Thrombusgewicht beider Gruppen auch unter Berücksichtigung einer gewissen Irrtumswahrscheinlichkeit als gleich interpretiert werden kann. In Folge dieser Berechnung wurden Blut-Mikropartikel als Kontrolle für tumoröse Mikropartikel herangezogen. Schlussfolgernd kann postuliert werden, dass Blut-Mikropartikel per se keinen prokoagulativen Effekt haben und dass die Applikation humaner Mikropartikel in den murinen Organismus das Gerinnungssystem nicht beeinflusst.

Die immunhistologischen Präparate von Blut-Mikropartikel induzierten Thromben, die mit dem Ziel gefertigt wurden einen Überblick über den Zellgehalt und die Zellverteilung in den Thromben zu erhalten, ließen erkennen, dass kernhaltige Zellen (DAPI-Färbung), respektive Leukozyten (CD45 positiv), diffus über den gesamten Querschnitt verteilt in den Thrombus eingelagert wurden. Aus den CD41- und Fibrinogenfärbungen wurde ersichtlich, dass die Thrombusmasse aus aggregierten Thrombozyten und Fibrin besteht. In der Fibrinogenfärbung stellte sich klar der schichtartige Aufbau des Thrombus heraus.



**Abbildung 17:** Immunhistologische Färbungen zur Beurteilung von Zellgehalt und Zellverteilung in einem Blut-Mikropartikel induzierten Thrombus.

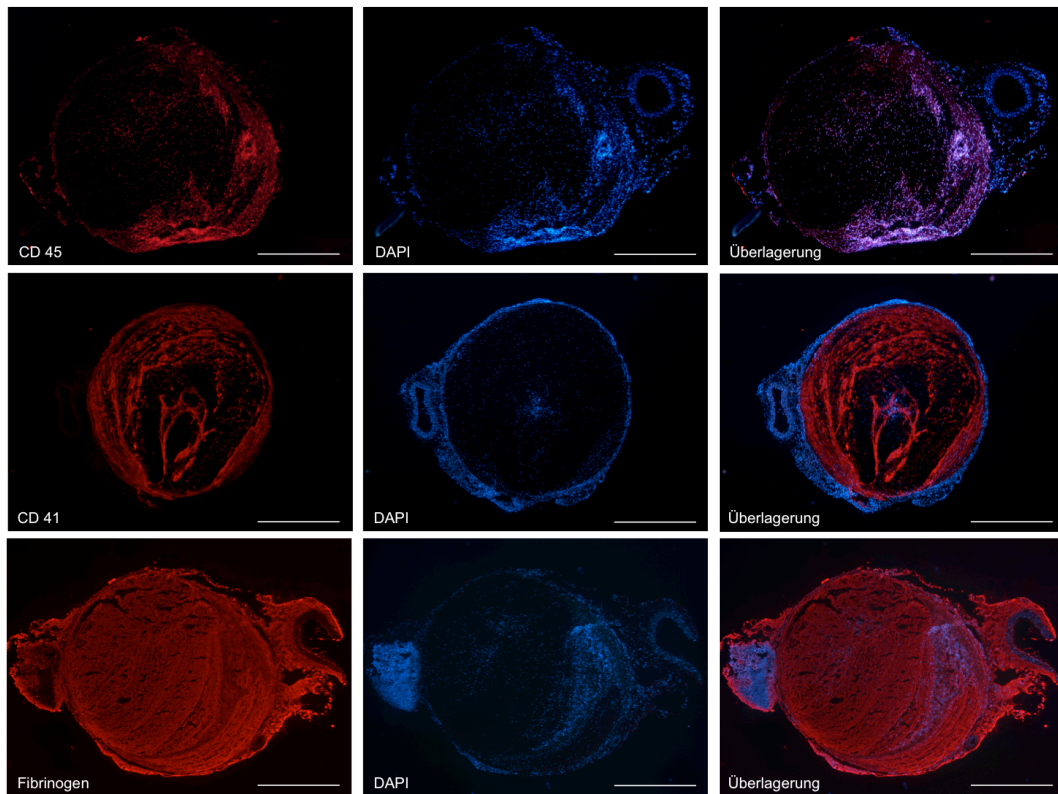
Maßstab = 200µm; a) Leukozytenfärbung, CD45 (rot), DAPI = Kernfärbung (blau); b) Thrombozytenfärbung, CD41 (rot), DAPI (blau); c) Fibrinogenfärbung, Fibrin (rot) DAPI (blau).

Die zwei Typen pancreaskarzinomatöser Mikropartikel - FG und L3.6pl - wurden ebenfalls im Hinblick auf Thrombusinzidenz und mittleres Thrombusgewicht mit der Blut-Mikropartikel-Kontrollgruppe verglichen.

FG-Zellen zeichnen sich durch schnelles Wachstum aber geringe Metastasierungsrate aus. Von den 8 Tieren, welche zwei Injektionen zu 150 µg FG-Mikropartikel i.v. erhielten, entwickelten 7 Tiere innerhalb der 48 h einen Thrombus. In dieser Gruppe war ein mittleres Thrombusgewicht von 26,1 mg ± 4,09 mg zu ermitteln. Statistisch war der Unterschied zur Blut-Mikropartikel-Gruppe hochsignifikant ( $p = 0,001$ ).

Die Immunhistologie eines FG-Mikropartikel induzierten Thrombus zeigte, dass die kernhaltigen, CD45 positiven Zellen vorwiegend randständig zu finden sind. Auch die CD41-Färbung ließ erkennen, dass Blutplättchen ebenfalls vermehrt endothelnah lokalisiert sind. Dahingegen wirkte die Fibrinmasse kompakt, geschichtet und füllte das gesamte Gefäßlumen aus. Insgesamt entstand der Ein-

druck, dass deutlich weniger Zellen in den Thrombus integriert wurden.



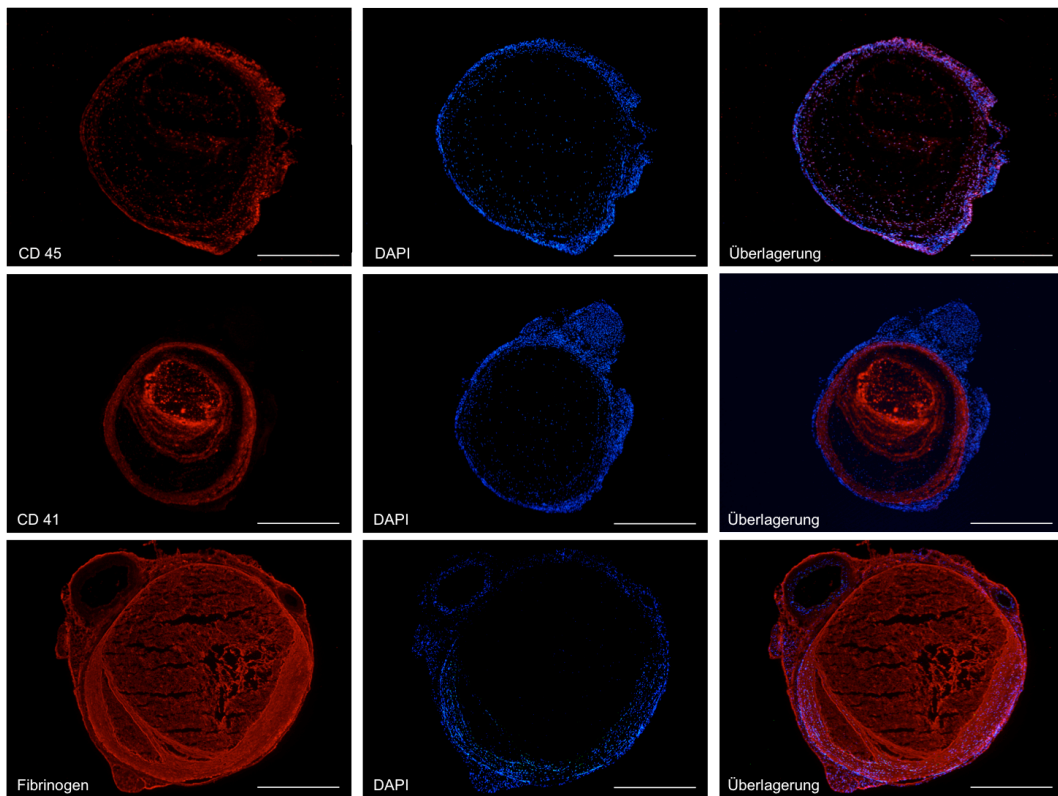
**Abbildung 18:** Immunhistologische Färbungen zur Beurteilung von Zellgehalt und Zellverteilung in einem FG-Mikropartikel induzierten Thrombus.

Maßstab = 200µm; a) Leukozytenfärbung, CD45 (rot), DAPI = Kernfärbung (blau); b) Thrombozytenfärbung, CD41 (rot), DAPI (blau); c) Fibrinogenfärbung, Fibrin (rot) DAPI (blau).

Im Falle der L3.6pl-Mikropartikel, die von schnell wachsenden Zellen mit hoher Metastasierungsrate abstammen, war bei allen Mäusen eine Thrombusbildung zu beobachten. Im Mittel waren die Thromben  $22,3 \text{ mg} \pm 4,36 \text{ mg}$  schwer. Auch hier zeigte sich ein signifikanter Unterschied verglichen mit der Kontrollgruppe ( $p = 0,006$ ).

Auch im Falle der L3.6pl-Mikropartikel machte die Immunhistologie deutlich, dass weniger CD45 positive Zellen zu finden waren, die vorwiegend endothelnahe lokalisiert sind. Im Hinblick auf die Verteilung der CD41 positiven Zellen fiel ein dichter, endothelnahe Saum auf sowie eine zweite, schichtförmig angeordnete Masse. Fibrin bildete auch im Falle der L3.6pl-Mikropartikel die Hauptmasse des Thrombus.





**Abbildung 19:** Immunhistologische Färbungen zur Beurteilung von Zellgehalt und Zellverteilung in einem L3.6pl-Mikropartikel induzierten Thrombus.

Maßstab = 200µm; a) Leukozytenfärbung, CD45 (rot), DAPI = Kernfärbung (blau); b) Thrombozytenfärbung, CD41 (rot), DAPI (blau); c) Fibrinogenfärbung, Fibrin (rot) DAPI (blau).

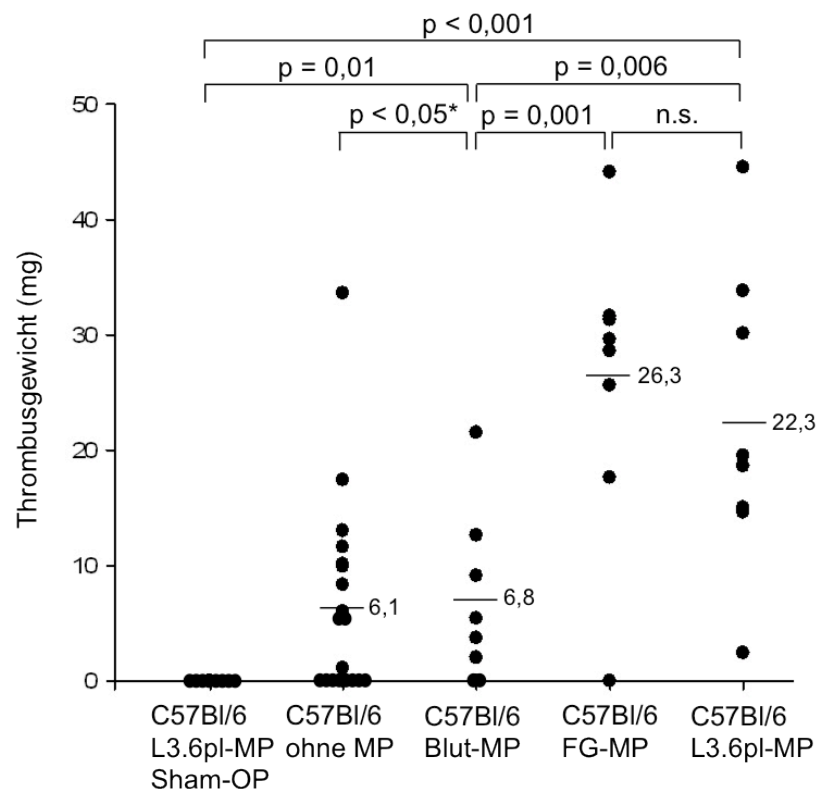
Zusammengenommen sprechen diese Ergebnisse dafür, dass tumoröse Mikropartikel die Thrombusbildung und -größe entscheidend beeinflussen. Zudem scheint die Malignität der Mikropartikel offenbar keinen Einfluss auf die Thrombogenität zu haben, denn der Vergleich von FG- und L3.6pl-Mikropartikeln zeigt eine ähnlich Thrombosierungsrate sowie ein vergleichbares Gewichtsniveau der entstandenen Thromben.

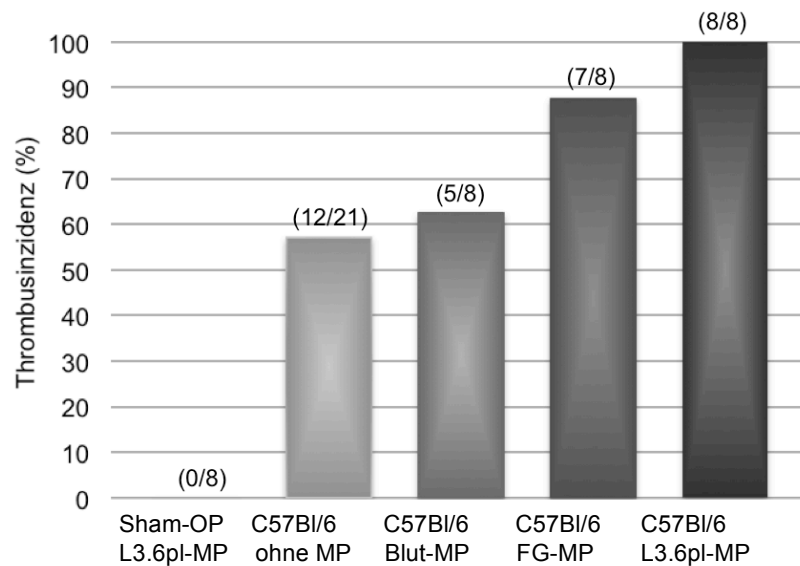
Letztlich wurde, um ausschließen zu können, dass manipulative Gefäßläsionen die Thrombogenese triggern und zu belegen, dass die Flussreduktion Initiator der stenotischen Phlebothrombose ist, 8 C57Bl/6J Tiere sham-operiert und L3.6pl-Mikropartikel appliziert. Keines dieser Tiere entwickelte einen makroskopischen Thrombus. Verglichen mit der Blut-Mikropartikel-Kontrollgruppe zeigte sich ein signifikanter Unterschied im Hinblick auf das mittlere Thrombusgewicht ( $p = 0,010$ ). Auch der Test auf Unterschied zur L3.6pl-Mikropartikel-Gruppe

machte einen statistisch signifikanten Unterschied deutlich ( $p < 0,001$ ).

Dieses Resultat erlaubte es schlussfolgernd fest zu halten, dass die Operation als Trigger der Thrombose ausgeschlossen werden kann und Tumormikropartikel alleine nicht in der Lage sind eine Thrombose zu induzieren, sondern dass zusätzlich eine Flussverlangsamung notwendig ist.

Dem explorativen Charakter dieser Studie folgend war ein aussagekräftiger Vergleich auf Unterschied (Fisher-Test) im Hinblick auf die Thrombusinzidenz der verschiedenen Versuchsgruppen in Folge der geringen Fallzahlen nicht möglich, sodass nachfolgendem und allen weiteren Inzidenzdiagrammen eine rein illustrative Funktion zuzuschreiben ist.





**Abbildung 20:** Einfluss von MP auf die Stenose-induzierte venöse Thrombose.

Dotplot: Vergleich der Thrombusgewichte; Querbalken = mittleres Thrombusgewicht

Säulendiagramm: Illustration der Thrombusinzidenz.

### **3. MIKROPARTIKEL GETRIGGERTER VENÖSE STENOSE IN GENETISCH MANIPULIERTEN LINIEN**

Da bei der Anwendung von L3.6pl-Mikropartikeln die höchste Thromboseinzidenz (8/8 Tieren) beobachtet werden konnte, wurden die nachfolgenden Versuche mit diesem Mikropartikeltyp durchgeführt. Ziel dieser Experimente war es, den Mechanismus der Mikropartikel-assoziierten Thrombose im Detail zu klären.

#### **3.1 P-Selektin knockout**

Im Hinblick auf die Stenose-induzierte TVT konnte bereits bewiesen werden, dass die Thrombusinzidenz bei SELP<sup>-/-</sup> Mäusen signifikant reduziert ist<sup>24</sup>.

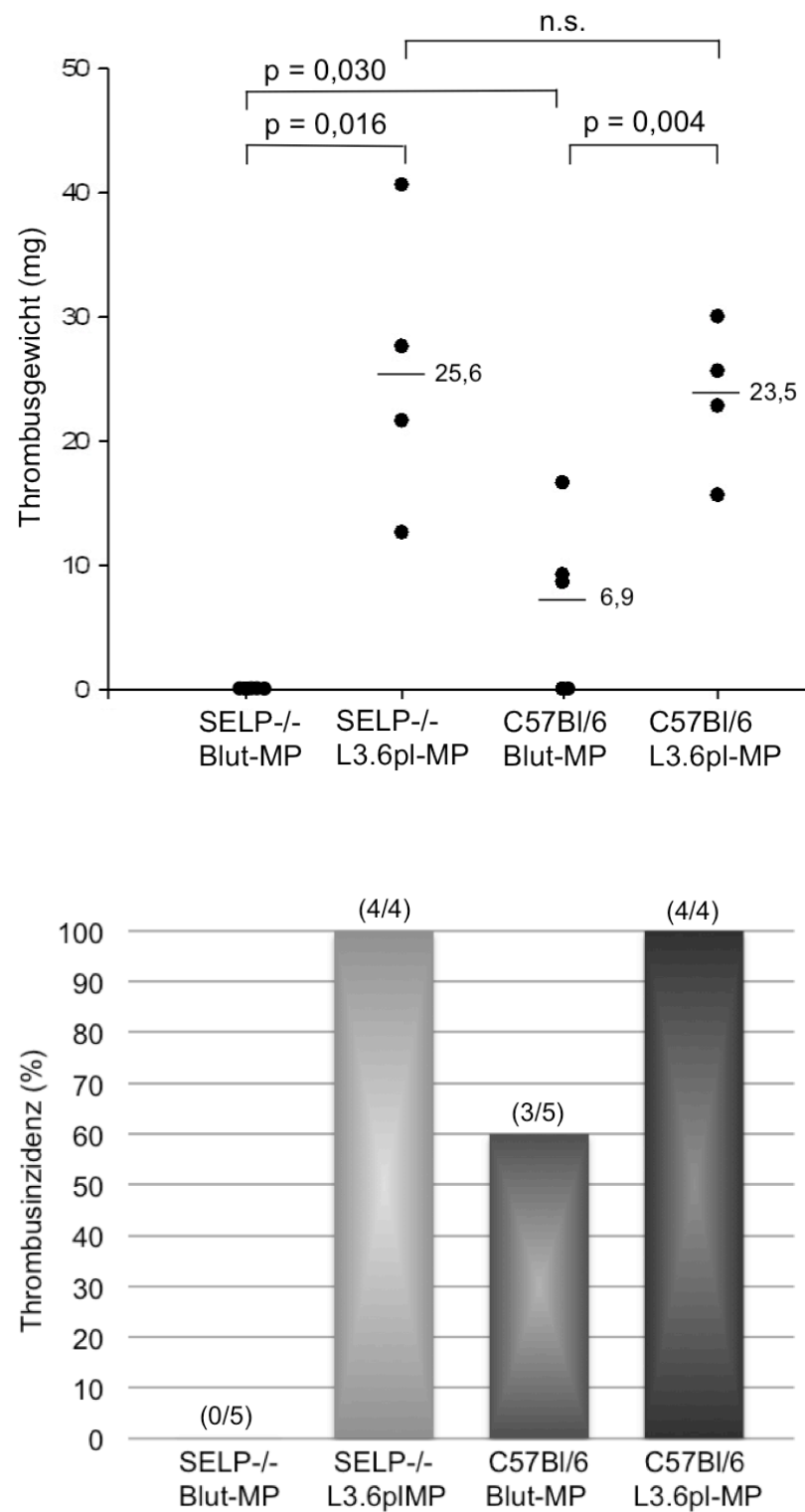
Ob der Knockout des Adhäsionsmoleküls P-Selektin auch die Entstehung der Mikropartikel-induzierten Phlebothrombose beeinflusst, sollte an SELP<sup>-/-</sup> Mäusen getestet werden. Bekanntermaßen ist P-Selektin verantwortlich für die Adhäsion von Leukozyten (über PSGL-1) und Thrombozyten (über vWF) an aktivierte Endothel sowie für die Leukozyten-Thrombozyteninteraktion.

Interessanterweise entwickelten nach Mikropartikelapplikation alle 4 SELP<sup>-/-</sup> Tiere, die jeweils zwei Injektionen zu 150 µg L3.6pl-Mikropartikel erhielten, einen Thrombus. Das mittlere Thrombusgewicht lag bei 25,6 mg ± 5,1 mg. Ebenso wie bei 4 C57Bl/6J Wildtypmäusen, die L3.6pl-Mikropartikel erhielten, zeigten die SELP<sup>-/-</sup> Tiere eine massive Thrombosierungsneigung. Das mittlere Thrombusgewicht beider Gruppen (C57Bl/6J + L3.6pl: 23,5 mg ± 2,6 mg) bewegte sich im gleichen Größenbereich, sodass statistisch kein Unterschied nachweisbar war (p = 0,381).

In der Kontrollgruppe von 5 SELP<sup>-/-</sup> Tiere, die Blut-Mikropartikel nach demselben Injektionsregime erhielten, war bei keinem Tier ein makroskopischer Thrombus detektierbar. Dieses Ergebnis unterschied sich stark von der SELP<sup>-/-</sup> Gruppe mit L3.6pl-Mikropartikeln und war auch statistisch signifikant (p = 0,016). Die stark prothrombotische Wirkung der L3.6pl-Mikropartikel konnte somit erneut bewiesen werden.

Schließlich wurde eine Gruppe von 5 C57Bl/6J Tieren, die Blut-Mikropartikel erhielten, untersucht. Die Thrombusinzidenz innerhalb dieser Gruppe lag bei 60 %, denn 3 der 5 Tiere entwickelten einen Thrombus und das mittlere Thrombusgewicht bei 6,9 mg ± 2,8 mg. Im Vergleich zu den SELP<sup>-/-</sup> Tieren mit Blut-Mikropartikeln, die keine Thrombosierungsneigung erkennen ließen, war ein statistisch signifikanter Unterschied nachweisbar (p = 0,030).

Obwohl der Mangel an P-Selektin im Stenosemodell die Thrombusbildung bei Wildtyptieren sowie bei Injektion von Blut-Mikropartikeln zu verhindern vermochte, hatte dieser Knockout bei Tumormikropartikeln keinen Effekt. Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, dass Tumormikropartikel 1.) zur Entfaltung ihrer prothrombotischen Wirkung unabhängig von P-Selektin sind und 2.) wahrscheinlich nicht auf die Leukozyten- und Thrombozytenadhäsion angewiesen sind, welche bei alleiniger Flussreduktion ohne Mikropartikeleinjektion die entscheidenden zellulären Faktoren sind. In den nachfolgenden Experimenten soll daher näher auf die Rolle von Thrombozyten und Leukozyten eingegangen werden.



**Abbildung 21:** Einfluss von P-Selektin auf die MP-getriggerte venöse Thrombose.

Dotplot: Vergleich der Thrombusgewichte; Querbalken = mittleres Thrombusgewicht

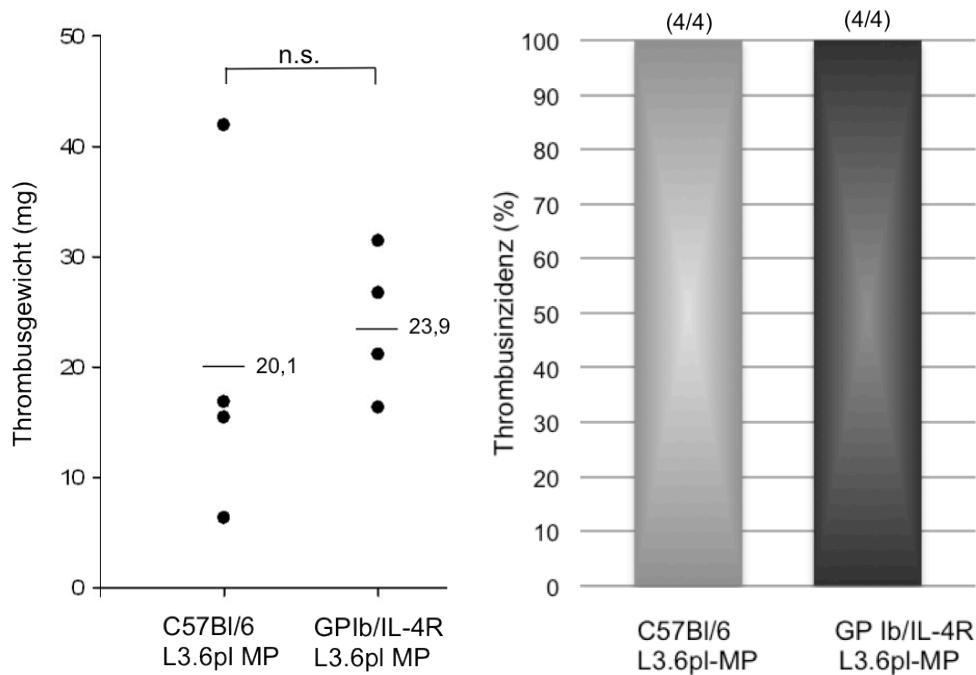
Säulendiagramm: Illustration der Thrombusinzidenz.

### **3.2 GPIIb<sub>3</sub> knockout**

Um die Frage zu klären, ob der Mangel von GPIIb als wichtigstem Adhäsionsmolekül der Thrombozyten die Mikropartikel-induzierte Thrombose im Stenosemodell eindämmen kann, wurden 4 Mäuse des Stammes GPIIb/IL-4R auf Thrombusbildung nach L3.6pl-Injektion hin untersucht.

Im Rahmen der physiologischen Hämostase vermittelt GPIIb die transiente Interaktion von Thrombozyten an das Endothel über vWF. Die adhärenenten Thrombozyten wiederum fördern die Leukozytenakkumulation und stimulieren Leukozyten zur NETosis im Mausmodell der TVT. Im Stenosemodell war festzustellen, dass der plättchenspezifische Knockout des GPIIb-Gens mit einer auf 20 % signifikant reduzierten Thrombusinzidenz einher ging<sup>24</sup>.

Im Mikropartikelsetting verlief die Thrombogenese in GPIIb/IL-4R Tieren allerdings ungehindert. Alle 4 Tiere entwickelten venöse Thromben mit einem mittleren Gewicht von  $23,9 \text{ mg} \pm 2,9 \text{ mg}$ . In der Kontrollgruppe mit 4 Tieren des Wildtypstammes, die L3.6pl-Mikropartikel erhielten, wiesen ebenfalls alle Tiere einen Thrombus auf. Das mittlere Gewicht der Thromben lag bei  $20,1 \pm 6,6 \text{ mg}$ . Tumormikropartikel verursachen somit, unabhängig von GPIIb und damit auch unabhängig von der Thrombozytenrekrutierung eine hochgradige Thrombusbildung. Ein Unterschied zwischen beiden Gruppen war aus statistischer Sicht nicht zu ermitteln ( $p = 0,333$ ).



**Abbildung 22:** Einfluss von thrombozytärem GPIIb auf die MP-induzierte venöse Thrombose.

Dotplot: Vergleich der Thrombusgewichte; Querbalken = mittleres Thrombusgewicht

Säulendiagramm: Illustration der Thrombusinzidenz.

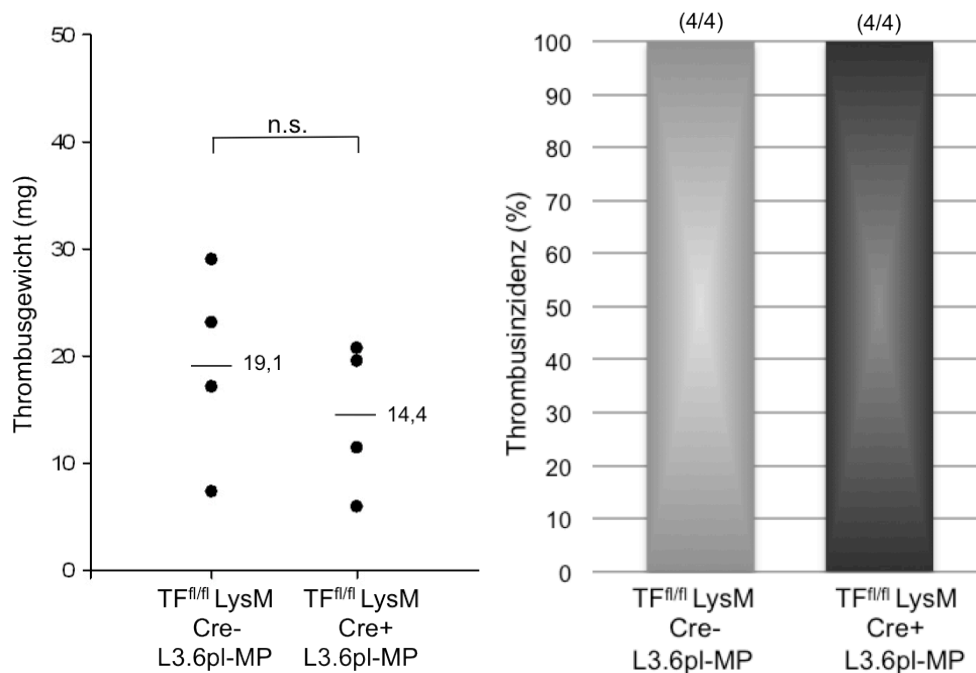
### 3.3 $TF^{fl/fl}$ LysM $Cre^+$

Da ohne Mikropartikelapplikation der TF myeloider Leukozyten den entscheidenden Trigger für die Fibrinbildung darstellt, wurde hier analysiert, ob dies auch bei Injektion von Tumormikropartikeln der Fall ist. Nachweislich verringerte der Mangel an myeloidem TF im TVT-Modell ohne Mikropartikel das mittlere Thrombusgewicht um 60,2 % auf  $3,88 \text{ mg} \pm 1,40 \text{ mg}$ , wobei die Thrombusinzidenz bei 61,7 %<sup>57</sup> lag.

Durch Einsatz  $Cre^+$  Tiere sollte erforscht werden, ob ein spezifischer Mangel an myeloidem TF die Entstehung eines Thrombus nach Injektion von Mikropartikeln beeinflusst.  $Cre^-$  Tiere dienten als Kontrolle.

Die Applikation von L3.6pl-Mikropartikeln verursachte bei allen ligierten  $TF^{fl/fl}$  LysM  $Cre^+$  sowie bei allen  $Cre^-$  Tieren eine venöse Thrombose. Das mittlere Thrombusgewicht betrug bei den  $Cre^+$  Mäusen  $14,4 \text{ mg} \pm 3,0 \text{ mg}$ , bei den  $Cre^-$  Tieren  $19,1 \text{ mg} \pm 4,0 \text{ mg}$ . Im statistischen Vergleich beider Gruppen bezüglich

der mittleren Thrombusgewichte lag kein Hinweis auf einen Unterschied vor ( $p = 0,168$ ). Die Thrombusinzidenz verhielt sich in beiden Gruppen identisch. Tumoröse Mikropartikel führen also unabhängig von myeloidem TF zu erhöhter Thrombosierungsneigung, wobei das mittlere Thrombusgewicht hinter der Kontrollgruppe zurück bleibt.



**Abbildung 23:** Einfluss des myeloiden TF auf die MP-induzierte venöse Thrombose.

Dotplot: Vergleich der Thrombusgewichte; Querbalken = mittleres Thrombusgewicht

Säulendiagramm: Illustration der Thrombusinzidenz.

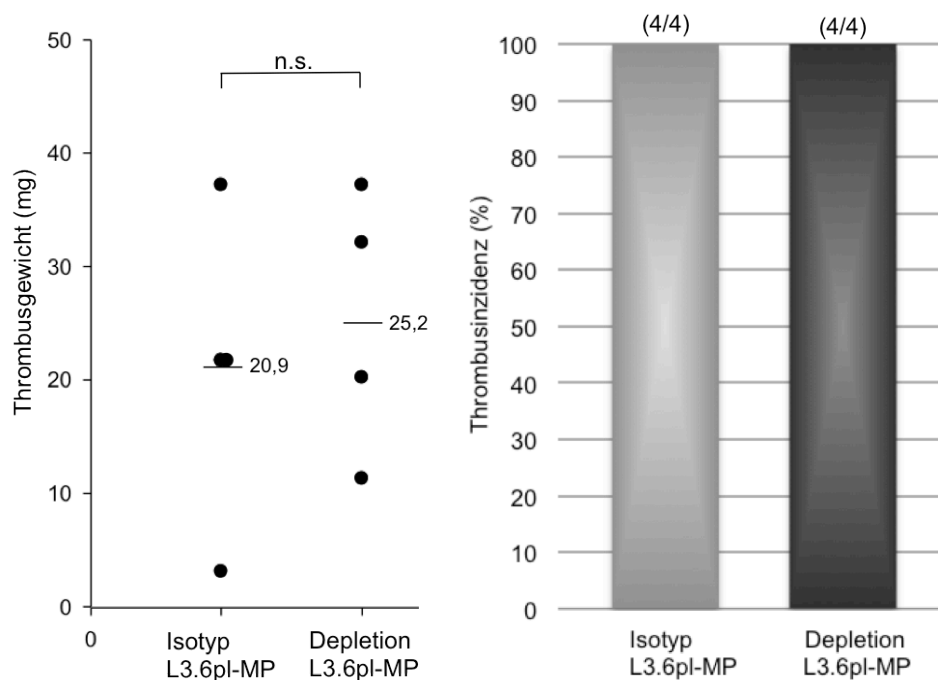
#### **4. MIKROPARTIKEL GETRIGGERT VON VENÖSE THROMBOSE UNTER EINSATZ SPEZIFISCHER ANTIKÖRPER UND INHIBITOREN**

##### **4.1 Thrombozytendepletion**

Nachdem zu beobachten war, dass die Thrombosierungsneigung im TVT-Modell bei Applikation tumoröser Mikropartikel unabhängig von GPIIb ist, wurde mit Hilfe der Thrombozytendepletion untersucht, ob es auch trotz vollständiger Abwesenheit von Blutplättchen zu einer Mikropartikel-induzierten Gerinnung und Thrombusbildung kommt.



An 4 Tieren wurde die Thrombozytendepletion durchgeführt und die Thrombozytopenie jeweils anhand eines Blutbildes bestätigt. Alle Tiere entwickelten innerhalb der 48 h einen Thrombus. Das mittlere Thrombusgewicht von  $25,2 \text{ mg} \pm 5,1 \text{ mg}$  bewegte sich dabei in einem ähnlichen Größenbereich wie das mittlere Thrombusgewicht von den 4 Kontrolltieren, die mit dem entsprechenden Isotyp behandelt wurden ( $20,9 \text{ mg} \pm 6,0 \text{ mg}$ ). Statistisch fiel kein Unterschied zwischen den Thrombusgewichten auf ( $p = 0,328$ ). Aus diesem Experiment wird ersichtlich, dass die tumorösen Mikropartikel die Thrombogenese unabhängig vom Einfluss der Plättchen triggern.



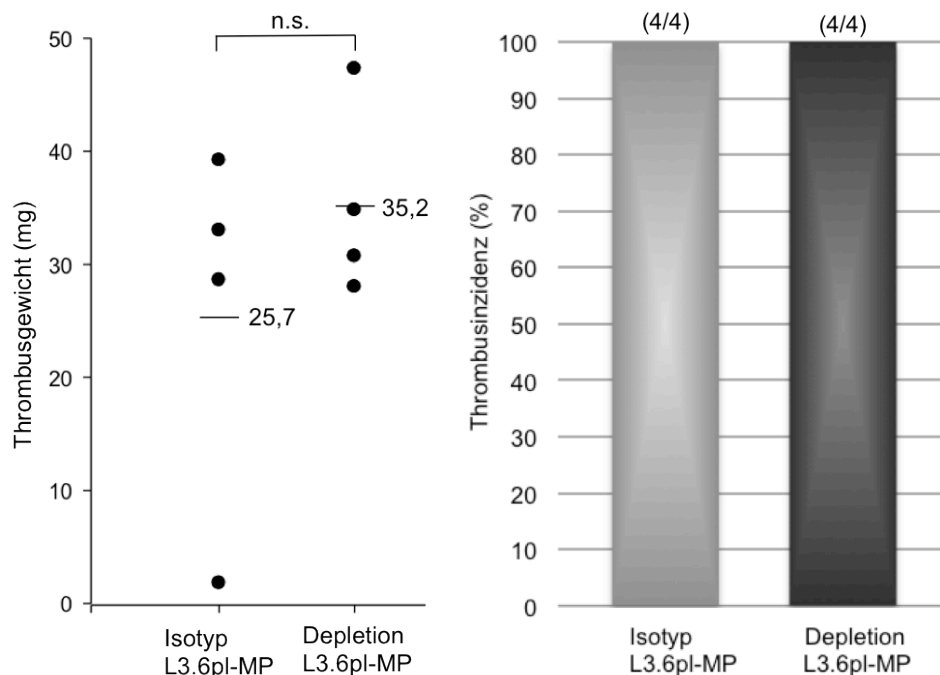
**Abbildung 24:** Einfluss der Thrombozytendepletion auf die MP-induzierte venöse Thrombose. Dotplot: Vergleich der Thrombusgewichte; Querbalken = mittleres Thrombusgewicht  
Säulendiagramm: Illustration der Thrombusinzidenz.

## 4.2 Neutrophilendepletion

Neutrophile Granulozyten können über die Bildung von NETs das intrinsische Gerinnungssystem aktivieren und somit zur Thrombusbildung beitragen<sup>24</sup>. Die Depletion von Neutrophilen in Wildtyptieren führte zu einer verringerten Thrombusinzidenz, die bei nur 20 % angesiedelt war sowie einem signifikant reduzier-

tem mittlerem Thrombusgewicht im Vergleich zur Isotypkontrolle<sup>24</sup>. Um die Rolle von neutrophilen Granulozyten im Zuge der Mikropartikel-vermittelten TVT zu untersuchen, wurde in einer Versuchsgruppe eine pharmakologische Depletion der Neutrophilen induziert.

Die Depletion von Neutrophilen in C57Bl/6J Tieren, die L3.6pl-Mikropartikel i.v. erhielten, zeigte keinen Einfluss auf die Thrombogenese, denn alle neutropenen Tiere entwickelten innerhalb von 48 h einen venösen Thrombus. Das mittlere Thrombusgewicht von  $35,2 \text{ mg} \pm 3,7 \text{ mg}$  unterschied sich aus statistischer Sicht dabei nicht ( $p = 0,172$ ) von den 4 Tieren, die mit dem entsprechenden Isotyp behandelt wurden und deren mittleres Thrombusgewicht von  $25,7 \text{ mg} \pm 7,1 \text{ mg}$  bei ebenfalls 100 %iger Thrombusinzidenz angesiedelt war. Zwar ist die Tendenz erkennbar, dass neutrophilendepletierte Tiere deutlich schwerere Thromben aufweisen, doch legen diese Resultate den Schluss nahe, dass die Mikropartikel-assoziierte Thrombogenese unabhängig von Neutrophilen verläuft.

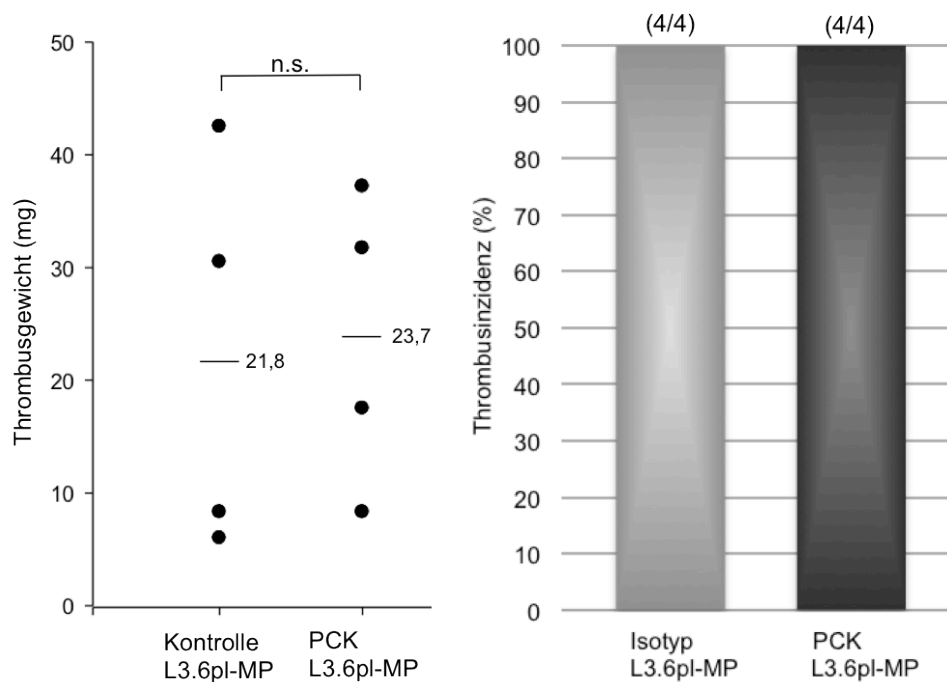


**Abbildung 25:** Einfluss der Neutrophilendepletion auf die MP-induzierte venöse Thrombose. Dotplot: Vergleich der Thrombusgewichte; Querbalken = mittleres Thrombusgewicht  
Säulendiagramm: Illustration der Thrombusinzidenz.

### 4.3 Inhibition des FXII

Um die Rolle des intrinsischen Gerinnungsweges im Zuge der Mikropartikel-assoziierten TVT zu untersuchen, wurde dieser Teil des Gerinnungssystems durch Inhibition des Faktors XII ausgeschaltet.

In einer Gruppe von 4 C57Bl/6J Tieren, denen i.v. der FXII-Inhibitor PCK appliziert wurde, ließen alle Tieren einen makroskopischen Thrombus erkennen; das mittlere Thrombusgewicht betrug  $23,7 \text{ mg} \pm 5,1 \text{ mg}$ . In der Kontrollgruppe, die anstelle des Inhibitors jeweils zwei Boli sterile NaCl i.v. erhielten und ebenfalls alle einen Thrombus zeigten, lag das mittlere Thrombusgewicht bei  $21,8 \text{ mg} \pm 7,7 \text{ mg}$ . Auch in dieser Gruppe war beim Vergleich des mittleren Thrombusgewichts kein Hinweis auf einen Unterschied vorhanden ( $p = 0,436$ ). Daraus wird ersichtlich, dass die Mikropartikel-getriggerte TVT unabhängig vom FXII und somit vom intrinsischen Gerinnungssystem verläuft.



**Abbildung 26:** Einfluss des FXII auf die MP-induzierte venöse Thrombose.

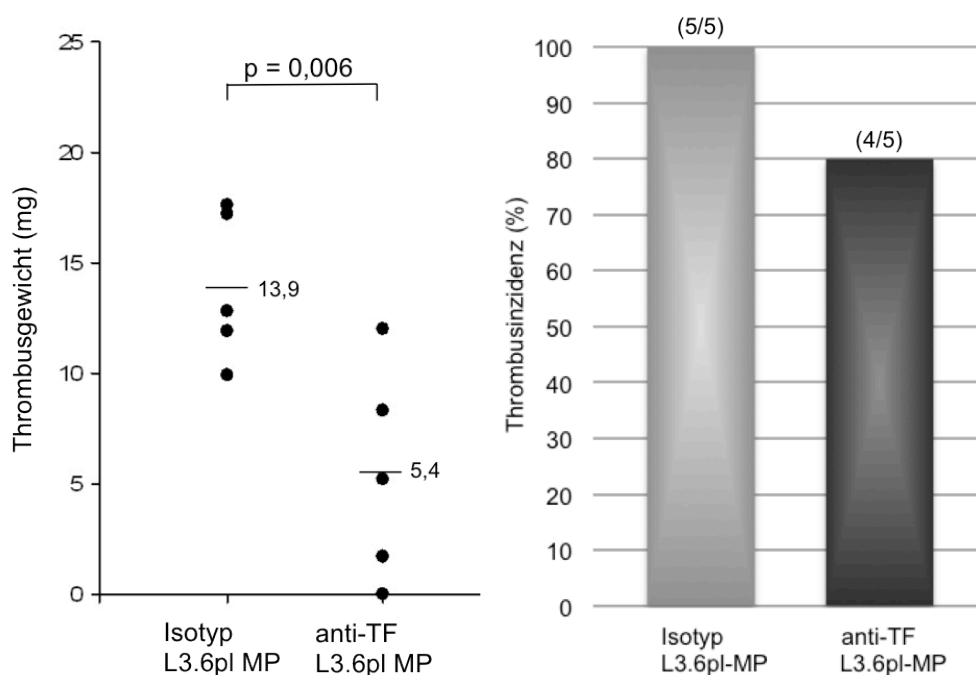
Dotplot: Vergleich der Thrombusgewichte; Querbalken = mittleres Thrombusgewicht

Säulendiagramm: Illustration der Thrombusinzidenz.

#### 4.4 Blockade des mikropartikulären TF

TF wird von Tumorzellen exprimiert und ist auf tumorösen Mikropartikeln im Blut von Tumorpatienten nachweisbar. TF gilt als Träger der prokoagulatorischen Aktivität und es häufen sich die Belege, dass zirkulierende TF<sup>+</sup> Mikropartikel mit erhöhter Gerinnungsbereitschaft bei Tumorerkrankung eine Rolle spielen<sup>110,120,132,134</sup>. Durch Präinkubation des Mikropartikelpellets mit einem spezifischen TF-Antikörper wurde versucht, die Aktivität von mikropartikulärem TF zu blockieren, um zu untersuchen, ob das prokoagulative Potential von tumorösen L3.6pl-Mikropartikeln vermindert werden kann.

Einer Gruppe von 5 Mäusen wurde nach dem bekannten Applikationsregime mit anti-TF Antikörper inkubierte Mikropartikel appliziert. 4 der 5 Tiere entwickelten einen Thrombus, wobei das mittlere Thrombusgewicht 5,4 mg  $\pm$  2,0 mg betrug. Dies ist signifikant reduziert im Vergleich zu der Kontrollgruppe, bestehend aus 5 Mäusen, die mit dem entsprechenden Isotyp inkubierte Mikropartikel erhielten ( $p = 0,006$ ). Deren mittlere Thrombusgewicht lag bei 13,9 mg  $\pm$  1,4 mg, wobei alle 5 Tiere Thromben entwickelten. Die Entwicklung einer Mikropartikel-assoziierte Thrombose ist somit deutlich abhängig von der Aktivität des mikropartikulären TF.



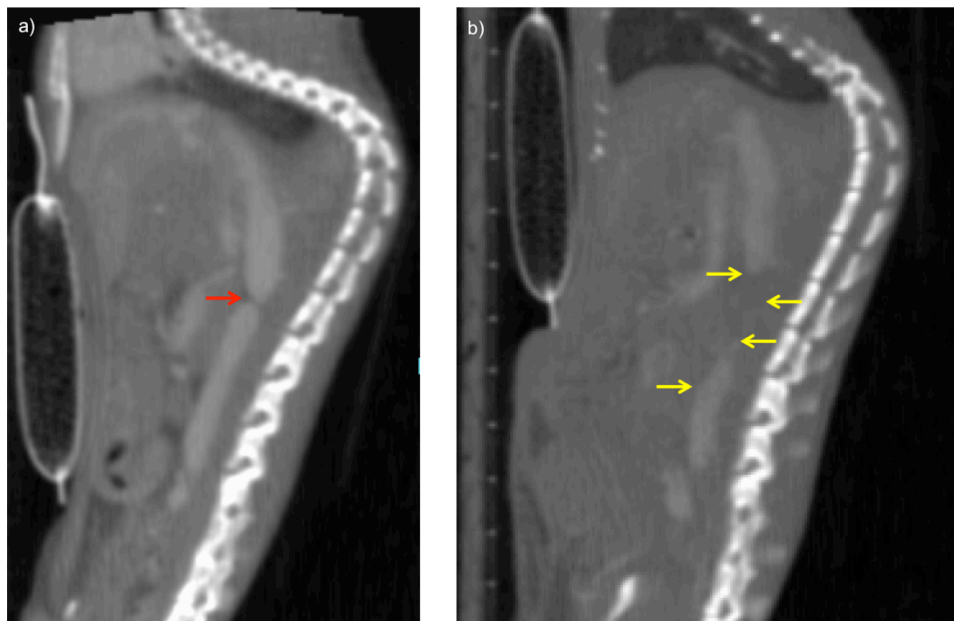
**Abbildung 27:** Einfluss des mikropartikulären TF auf die MP-induzierte venöse Thrombose.

Dotplot: Vergleich der Thrombusgewichte; Querbalken = mittleres Thrombusgewicht

Säulendiagramm: Illustration der Thrombusinzidenz.

## 5. COMPUTERTOMOGRAPHIE

Computertomographische Untersuchungen, angefertigt 48 h nach Ligatur, kurz vor der Entnahme des Thrombus, ermöglichten eine Diagnose der venösen Thrombose in vivo. Von den 2 Tieren, die Blut-Mikropartikel erhielten, entwickelte ein Tier keinen Thrombus. In den Aufnahmen dieses Tieres ist die einengende Ligatur nach Kontrastmittelapplikation deutlich sichtbar (Abb. 28a). Ein Tier wurde mit L3.6pl-Mikropartikeln behandelt und ebenfalls einem CT-Scan unterworfen. Das Gerinnsel dieser Maus stellte sich im CT deutlich als Kontrastmittel-freie Region dar (Abb. 28b). Damit war der Beweis erbracht, dass es sich bei den Stenose-induzierten, nach 48 h entnommenen Thromben nicht um post-mortale Gebilde handelt. Zudem stellte sich die Computertomographie als potente und schonende Methode dar, um venöse Thromben in vivo visualisieren zu können.



**Abbildung 28:** CT Aufnahmen im Sagittalschnitt.

a) Rumpf einer Maus mit Blut-Mikropartikeln ohne Thrombusbildung, einengende Ligatur sichtbar (roter Pfeil); b) Rumpf einer Maus mit L3.6pl-Mikropartikeln mit Thrombusbildung (begrenzt von gelben Pfeilen).

## 6. ULTRASCHALLUNTERSUCHUNGEN

Ultrasonographische Untersuchungen wurden mit dem Ziel durchgeführt, den Verlauf der Thrombogenese in vivo verfolgen zu können. Mit Hilfe dieser Technik sollte evaluiert werden, ob sich venöse Thromben in der Vena cava caudalis nicht invasiv darstellen lassen und wie sich die Dynamik der Mikropartikel-assoziierten Thrombose verhält.

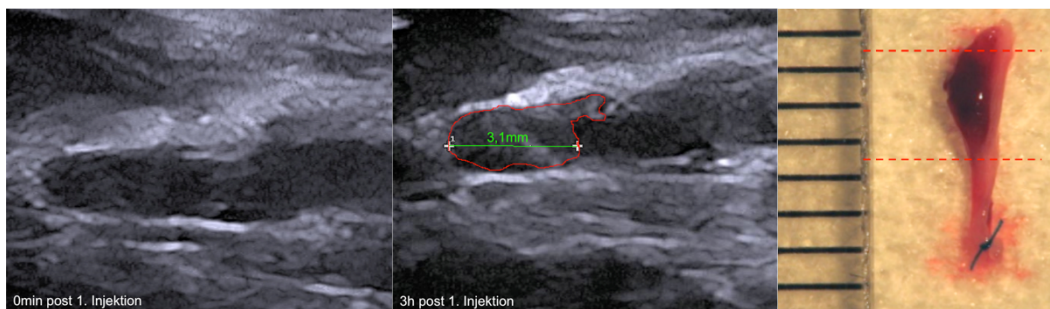
### 6.1 Übersicht zur Entstehungsdynamik von L3.6pl-assoziierten Thromben

In einer ersten Versuchsgruppe wurden 3 Tiere, die tumoröse L3.6pl-Mikropartikel erhielten, über 3 h hinweg zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Platzierung der Ligatur mittels Ultraschall untersucht, um einen Überblick über die Entstehungsdynamik eines Thrombus zu gewinnen. Bei allen Tieren wurden in 30 minütigem Abstand sonographische Aufnahmen gefertigt und an Hand dieser Aufnahmen die Länge und die Fläche der aktuellen Thrombusmasse bestimmt.

|                            |                       | Maus 1                    |                           | Maus 2                    |                           | Maus 3                    |                           |
|----------------------------|-----------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|
| Zeitspanne der Sonographie |                       | 1.-3. h post 1. Injektion |                           | 4.-7. h post 1. Injektion |                           | 1.-3. h post 2. Injektion |                           |
| Messparameter              |                       | max. Thrombuslänge (mm)   | Fläche (mm <sup>2</sup> ) | max. Thrombuslänge (mm)   | Fläche (mm <sup>2</sup> ) | max. Thrombuslänge (mm)   | Fläche (mm <sup>2</sup> ) |
| Zeit nach Schallbeginn     | 0 min nach Injektion  | -                         | -                         | 1,3                       | keine Aufnahme            | 4,1                       | 5.305                     |
|                            | 30 min nach Injektion | 3,1                       | 3.642                     | 1,4                       | 1.722                     | 6,7                       | 9.984                     |
|                            | 1 h nach Injektion    | 2,9                       | 3.146                     | 1,6                       | 1.905                     | 8                         | 12.051                    |
|                            | 3 h nach Injektion    | 3,1                       | 4.264                     | 2,8                       | 3.805                     | 6,2                       | 10.782                    |
| Gewicht bei Entnahme       |                       | 0,5 mg                    |                           | 3,7 mg                    |                           | 20,2 mg                   |                           |
| Länge bei Entnahme         |                       | 3,0 mm                    |                           | 3,0 mm                    |                           | 7,8 mm                    |                           |

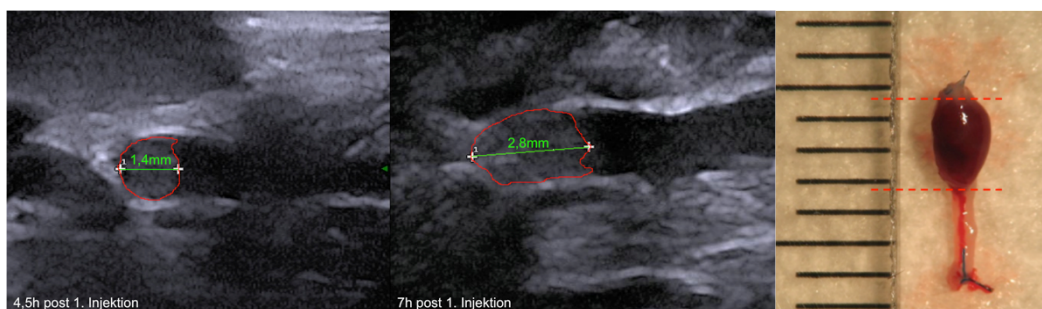
**Tabelle 16:** Dynamik der L3.6pl-induzierten Thrombogenese nach der 1. / 2. Mikropartikelinjektion mit sofortiger Thrombusentnahme.

Maus 1 wurde innerhalb der ersten 3 h nach der ersten Mikropartikelinjektion untersucht. Während direkt nach der Applikation noch kein Thrombusmaterial zu erkennen war, hatte sich 30 min später bereits ein Clot von 3,1 mm Länge (entspricht einer Fläche von 3,642 mm<sup>2</sup>) gebildet. Im weiteren Verlauf traten nur geringe Schwankungen der Thrombus-masse auf; 3 h nach Mikropartikelinjektion lag die Länge bei 3,1 mm (Fläche 4,264 mm<sup>2</sup>). Der direkt nach der letzten Schalluntersuchung entnommene Thrombus hatte makroskopisch eine Länge von 3,0 mm, bei einem Gewicht von 0,5 mg.



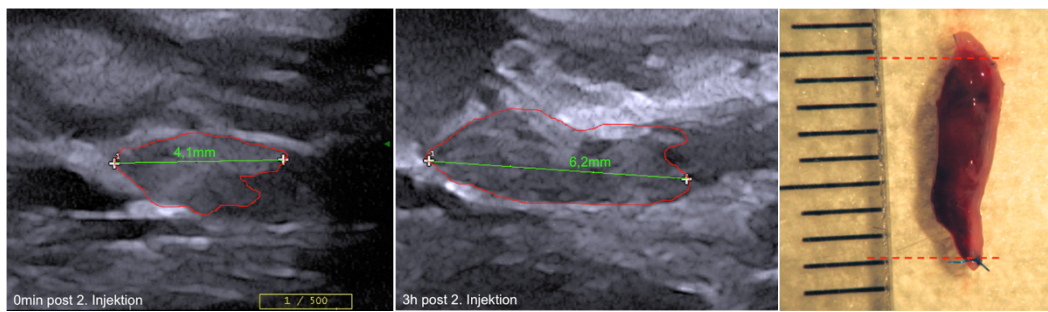
**Abbildung 29:** Ultraschallbefunde 0 min nach und 3 h nach der 1. Mikropartikelinjektion sowie entnommener Thrombus makroskopisch.

Um den weiteren Verlauf der Thrombusbildung darzustellen wurde Maus 2 im Zeitraum von der 4.-7. h nach der ersten Mikropartikelinjektion untersucht. Bei diesem Tier war ein kontinuierliches Längenwachstum des Thrombusmaterials zu beobachten. 4 h nach der 1. Injektion (Zeitpunkt 0 min) betrug die Länge des Thrombus 1,3 mm und wuchs bis zur letzten Schalluntersuchung 7 h nach der ersten Injektion (Zeitpunkt 3 h) bis auf eine Länge von 2,8 mm (Fläche 3,805 mm<sup>2</sup>). Makroskopisch konnte eine Länge von 2,9 mm gemessen werden.



**Abbildung 30:** Ultraschallbefunde 4,5 h nach und 7 h nach der 1. Mikropartikelinjektion sowie entnommener Thrombus makroskopisch.

Im Falle von Maus 3, die innerhalb der ersten 3 h nach der zweiten Mikropartikelinjektion untersucht wurde, war zum Zeitpunkt der ersten Schallaufnahme eine Thrombusmasse von 4,1 mm Länge (Fläche 5,305 mm<sup>2</sup>) vorhanden, die innerhalb der ersten 30 min auf 6,7 mm (Fläche 9,984 mm<sup>2</sup>) anwuchs. Im Zuge der letzten Aufnahme nach 3 h konnte eine Länge von 6,2 mm (Fläche 10,782 mm<sup>2</sup>) ermittelt werden. Der entnommene Thrombus wies eine Länge von 7,8 mm auf. Dabei ist der Längenunterschied in vivo und ex vivo auf einen sehr dünnen, im Gefäß flotierenden Thrombusschwanz zurückzuführen, der in Folge seiner Beweglichkeit sonsographisch nicht erfasst werden konnte.



**Abbildung 31:** Ultraschallbefunde 0 min nach und 3 h nach der 2. Mikropartikelinjektion sowie entnommener Thrombus makroskopisch.

Aufbauend auf den Erkenntnissen aus dieser ersten Versuchsgruppe wurden 3 weitere Tiere, ebenfalls über einen Zeitraum von 3 h nach der zweiten Mikropartikelinjektion, geschallt. Diese Tiere überlebten bis zum regulären Ende des chronischen Versuchs 48 h nach der stenosierenden Operation. Erst dann wurde der Thrombus entnommen.



|                            |                       | Maus 4                   |                           | Maus 5                   |                           | Maus 6                   |                           |
|----------------------------|-----------------------|--------------------------|---------------------------|--------------------------|---------------------------|--------------------------|---------------------------|
| Zeitspanne der Sonographie |                       | 1.-3.h post 2. Injektion |                           | 1.-3.h post 2. Injektion |                           | 1.-3.h post 2. Injektion |                           |
| Messparameter              |                       | max. Thrombuslänge (mm)  | Fläche (mm <sup>2</sup> ) | max. Thrombuslänge (mm)  | Fläche (mm <sup>2</sup> ) | max. Thrombuslänge (mm)  | Fläche (mm <sup>2</sup> ) |
| Zeit nach Schallbeginn     | vor Injektion         | 1,8                      | 1,38                      | 2,3                      | 3,08                      | 5,5                      | 7,78                      |
|                            | 30 min nach Injektion | 5,5<br>(1,9+3,6)         | 1,28                      | 4,1                      | 5,37                      | 10,7                     | 15,02                     |
|                            | 1 h nach Injektion    | 5,8                      | 3,72                      | 4,2                      | 5,95                      | 11,1                     | 15,03                     |
|                            | 3 h nach Injektion    | 5,5<br>(1,7+3,8)         | 4,24                      | 6,8<br>(4,3+2,5)         | 7,48                      | 10,6                     | 15,83                     |
|                            | Gewicht nach 48 h     | 6 mg                     |                           | 20,9 mg                  |                           | 28,7 mg                  |                           |
|                            | Länge nach 48 h       | 5,5 mm                   |                           | 6,8 mm                   |                           | 10,5 mm                  |                           |

**Tabelle 17:** Dynamik der L3.6pl-induzierten Thrombogenese in der 1.-3. h nach der 2. Injektion.

Die aus diesen 3 Mäusen gewonnenen Daten konnten wie folgt zusammengefasst werden: Bei allen 3 Tieren war vor der 2. Mikropartikelinjektion ein Gerinnsel erkennbar, das im Mittel 3,4 mm (mittlere Fläche von 4,387 mm<sup>2</sup>) lang war. Der Effekt der 2. Mikropartikelportion ließ sich schon 30 min später erkennen, denn das Thrombusmaterial war auf eine mittlere Länge von 6,8 mm (8,163 mm<sup>2</sup>) angewachsen. Nach weiteren 30 min war eine geringe Längenzunahme von 0,5 mm auf 7,3 mm (9,189 mm<sup>2</sup>) zu verzeichnen. Auch 3 h nach der zweiten Injektion betrug die sonographische Länge 7,3 mm (9,581 mm<sup>2</sup>). Die entnommenen Thromben wiesen 48 h nach Versuchsbeginn ein mittleres Gewicht von 18,5 mg und eine mittlere Länge ex vivo von 7,6 mm auf.

Die Untersuchungen zur Entstehungsdynamik Mikropartikel-induzierter Thromben demonstrieren, dass die erste Mikropartikelinjektion die initiale Thrombogenese triggert und eine erste Gerinnselformation zur Folge hat, während die zweite Injektion, aufbauend auf dem bestehenden Clot, eine starke Massenzunahme verursacht.

## **6.2 Blut-Mikropartikel-assoziierte Thrombogenese**

Um die Entstehungsdynamik von Thromben nach Applikation tumoröser Mikropartikel vergleichend zu einer Kontrollgruppe beurteilen zu können, wurden 3 Tiere, die Blut-Mikropartikel erhielten, nach der zweiten Mikropartikelinjektion über 3 h hinweg geschallt.

Im Falle der Blut-Mikropartikelapplikation konnte zum Zeitpunkt direkt vor der zweiten Injektion bei keinem Tier eine solide Thrombusmasse im Ultraschall dargestellt werden. Auch im Laufe der 3 h nach der zweiten Injektion war die Ausbildung einer soliden Zellmasse nicht zu beobachten. Lediglich ein Tier hatte einen schwach echogenen Bereich direkt caudal der Ligatur, der jedoch intrinsische Bewegung erkennen ließ. Bei diesem Tier war zum Zeitpunkt der Entnahme nach 48 h ein kleines Gerinnsel von 1,2 mg nachweisbar. Die anderen beiden Mäuse entwickelten keinen Thrombus.

Weder durch die erste Injektion von Blut-Mikropartikel, noch durch die zweite Injektion war eine Aktivierung der Gerinnung mit folgender Thrombusformation zu erkennen. Es besteht kein Zusammenhang zwischen Blut-Mikropartikelinjektion und Thrombogenese.

## **6.3 Dynamik der Mikropartikel-assoziierten Thrombogenese**

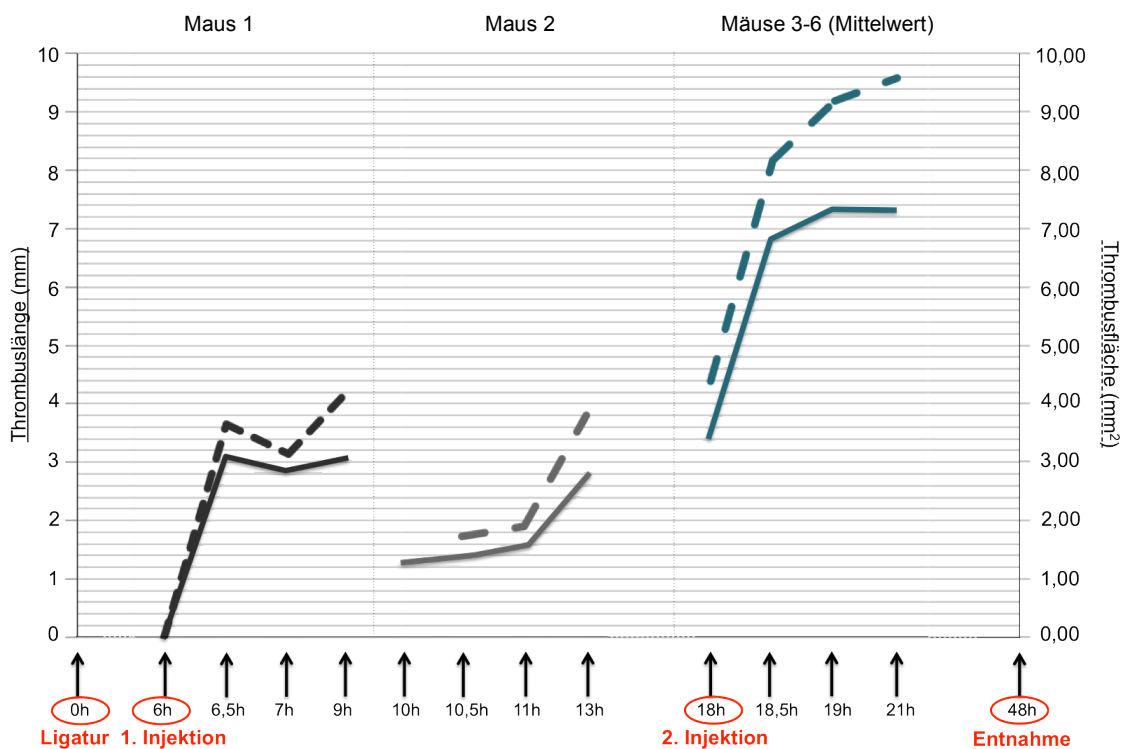
Eine deutliche Massenzunahme erfuhr das sich bildende intravasale Gerinnsel jeweils direkt nach den Injektionen von L3.6pl-Mikropartikeln.

Bei Maus 1 entwickelte sich innerhalb der ersten 30 min nach der ersten Injektion eine solide Thrombusmasse von 3,1 mm Länge die im Weiteren nicht größer wurde.

Maus 2 ließ ein kontinuierliches Wachstum beobachten; eine Längen-zunahme über den Untersuchungszeitraum vom 3 h von 115 % konnte errechnet werden.

Da die Mäuse 3-6 im gleichen Zeitraum - 1.-3. h nach der zweiten Mikropartikelinjektion - geschallt wurden, wurde der Mittelwert aller 4 Tiere graphisch dargestellt. Es wurde ersichtlich, dass es auch innerhalb der ersten 30 min nach der zweiten Injektion zu einer massiven Thrombus-bildung kommt.

Vor bzw. zum Zeitpunkt dieser Injektion betrug die mittlere Thrombuslänge 3,4 mm und wuchs in nur 30 min auf die doppelte Länge von 6,8 mm an, was einer Massenzunahme von 100 % entsprach. Das Gerinnungsgeschehen war innerhalb der ersten 30 min nach den Injektionen massiv und ab 1 h nach Injektion waren nur noch geringgradige Schwankungen der Thrombusgröße zu verzeichnen. Im Vergleich dazu konnte bei keinem der 3 geschallten Mäuse, die mit Blut-Mikropartikeln behandelt wurde ein intravasaler Thrombus dargestellt werden.



**Abbildung 32:** Graphische Darstellung der Entwicklung von Thrombuslänge und Thrombusfläche in Abhängigkeit vom Zeitverlauf nach Mikropartikelinjektion.

Durchgezogene Linien = Entwicklung der Thrombuslänge; gestrichelte Linien = Entwicklung der Thrombusfläche; schwarze Linien = Maus 1 (0 min bis 3 h nach erster Injektion); graue Linien = Maus 2 (4 h bis 7 h nach erster Injektion); blaue Linien = Mittelwert der Mäuse 3-6 (direkt vor bis 3 h nach der zweiten Injektion).

## **VI. DISKUSSION**

### **1. WAHL DER MAUSLINIEN**

Die Wahl der Maus als Versuchstier begründet sich aus der vergleichsweise leichten Haltung und dem einfachen Handling sowie aus der Tatsache, dass verschiedenste genetisch modifizierte Stämme zur Verfügung stehen. Auch im Hinblick auf cardiovaskuläre Fragestellungen stehen zahlreiche Knockout-, Knockin- oder gefloxt Stämme zur Auswahl, sodass der Einfluss diverser Zelltypen und Proteine auf die Thrombogenese spezifisch untersucht werden kann.

Der Inzuchtstamm C57Bl/6J wurde in der vorliegenden Arbeit als Wildtypstamm herangezogen, an dem die Standardisierung des venösen Stenosemodells sowie die Evaluation des Effekts von Mikropartikeln auf die Thrombusbildung erfolgte. Desweiteren wurden C57Bl/6J Tiere als Kontrollstamm für die verschiedenen genetisch manipulierten Stämme, die auf C57Bl/6J-Hintergrund gezüchtet wurden, herangezogen<sup>139,141-144</sup>. Auch die Depletions- und Inhibitorversuche wurden an Tieren dieses Stammes durchgeführt.

### **2. DAS STENOSEMODELL MIT PARTIELLER FLUSSREDUKTION ALS TIERMODELL DER SPONTANEN VENÖSEN THROMBOSE**

Gemäß den Erkenntnissen von Virchow wird die Entstehung eines venösen Thrombus durch drei Grundmechanismen getriggert: Endothelläsion, Hyperkoagulabilität und Änderung der Hämodynamik<sup>5</sup>. Die verschiedenen tierexperimentellen Modelle nutzen entweder eine operativ induzierte Änderung der Flussdynamik des Blutes (Stase-, Stenosemodell)<sup>21,24,26-28</sup> oder eine gezielt gesetzte Läsion des Endothels (FeCl<sub>3</sub>, Laserverletzung, photochemische Endothelverletzung) zur Induktion venöser Thrombosen<sup>25,26,159,160</sup>. Doch sind Ergebnisse aus Studien, bei denen Thrombose durch Endothelläsion induziert wird nicht dafür geeignet, Rückschlüsse auf die Pathomechanismen der häufig auftretenden spontanen tiefen Venenthrombose zu ziehen. Wie man heute

weiß, ist die spontane TVT in der Regel nicht auf Schädigung der Endothelstruktur, sondern auf Änderung der Hämodynamik zurück zu führen. Verschiedene Risikofaktoren, die mit längeren Phasen der Immobilisierung einhergehen und somit mit einem reduzierten Rückfluss des venösen Blutes zum Herzen durch Ausfall der Muskelpumpe, fördern die Entstehung von TVT<sup>10,12,14,15,34,35</sup>. Sevitt konnte zeigen, dass bei einem Großteil der von ihm histologisch untersuchten humanen tiefen Venenthromben die Integrität des Endothels vollständig erhalten war<sup>10</sup>. Ebenso werden Modelle, die mit vollständiger Stase in den venösen Gefäßen arbeiten, den pathophysiologischen Mechanismen der venösen Thrombose nicht gerecht. Auch im Falle von z.B. Ruhigstellung durch Gips oder anderweitiger Immobilisierung ist ein gewisser Restblutfluss im venösen Schenkel zu registrieren, da weitere Mechanismen (Ventilmechanismus der Venenklappen und Atmungspumpe) den venösen Rückfluss zum Herzen sicherstellen<sup>12</sup>.

Vollständig sistierender Blutfluss wird im Tiermodell entweder durch Ligatur oder Abklemmen des Gefäßes erreicht. Dabei wird der An- und Abtransport von Blutzellen, Gerinnungsfaktoren und Proteinen allerdings komplett unterbunden. Dies ist im Falle der spontanen venösen Thrombogenese nicht der Fall - eine Vergleichbarkeit zu Situationen beim immobilisierten Patienten ist somit also nicht gegeben<sup>26</sup>.

Zur Erforschung des Effekts von tumorösen Mikropartikeln auf die Entstehung von Phlebothrombosen fiel die Wahl aus Gründen der Übertragbarkeit der Ergebnisse auf das venöse Stenosemodell mit reduzierter Blutströmungsgeschwindigkeit. Durch Ligatur der Vena cava caudalis unter Einsatz eines Platzhalters wird sichergestellt, dass ein verlangsamter, aber bestehender Blutfluss erhalten bleibt. Der Beweis, dass die Integrität des Endothels unangetastet bleibt konnten v. Brühl und Stark in elektronenmikroskopischen Untersuchungen erbringen<sup>23,24</sup>.

In der aktuellen Studie wurde das Modell, um mögliche Durchführungsfehler im Vorhinein auszuschließen und die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse gewährleisten zu können, zunächst im Hinblick auf die Blutflussgeschwindigkeit standardisiert, was mit Hilfe intravitalmikroskopischer Aufnahmen gelang. Vor und

nach Platzieren der Ligatur wurde bei einer Gruppe von Tieren Aufnahmen gefertigt und die Strömungsgeschwindigkeit zu den beiden Zeitpunkten berechnet. Durch die stenosierende Operation wurde eine Reduktion des Blutflusses um 70,3 % erzielt.

Die generierten Thromben wiesen eine charakteristische makroskopische Morphologie auf. Ähnlich der makroskopischen Erscheinung von humanen Thromben<sup>10</sup> zeigten die murinen Stenose-induzierten Thromben ein charakteristisches Muster. Der Ligaturstelle anliegend fand sich ein roter Bereich, dem sich nach kaudal weiße und rote Thrombusbereiche anschlossen.

Das venöse Stenosemodell mit partieller Flussreduktion spiegelt die Pathomechanismen der spontanen venösen Thrombose wesentlich realistischer wider als die anderen in vivo Thrombosemodelle, die mit einer Endothelschädigung oder vollständiger Stase einhergehen<sup>26</sup>. Es erlaubt die Schlussfolgerung, dass allein die Änderung der Hämodynamik als Stimulus für die Thrombusbildung ausreichend ist. Der makro- und mikroskopische Bau der generierten Thromben gleicht zudem dem Bau von Thromben bei tiefen Venenthrombosen von humanen Patienten.

### **3. THROMBOSEINDUKTION ALS SPEZIFISCHER EFFEKT VON TUMORMIKROPARTIKELN**

Tumorpatienten leiden an einem etwa 6fach höheren Risiko an venöser Thromboembolisation zu erkranken als die gesunde Bevölkerung<sup>119</sup>. Neben dem Grundleiden wirkt sich eine symptomatische Manifestation der TVT zusätzlich negativ auf die Lebensqualität und die Prognose von Tumorpatienten aus<sup>122</sup>. Besonders häufig von der Ausbildung von Phlebothrombosen sind Patienten betroffen, die an hochgradig malignen Tumoren vom Typ mucinöses Adenokarzinom leiden. Darunter ist vor allem das Pancreaskarzinom mit einer hohen Thromboseinzidenz von bis zu 57 % assoziiert<sup>126-128</sup>.

Immer mehr Studien befassen sich mit dem Zusammenhang von Tumorleiden und Hyperkoagulabilität. Dabei rücken tumoröse Mikropartikel verstärkt in den Focus, die durch die starke Akkumulation von TF, dem Initiator der extrinsi-

schen Gerinnung, ein hohes prokoagulatorisches Potential haben. Schon mehrere Studien konnten belegen, dass im Blut von Tumorpatienten vermehrt TF<sup>+</sup> Mikropartikel nachweisbar sind und dass die Mikropartikel-assoziierte TF-Aktivität erhöht ist<sup>71,86,87,120,130,132,134,161</sup>. Allerdings gab es bisher noch kein verlässliches in vivo Modell, mit dem explizit der Effekt tumoröser Mikropartikel auf die Thrombogenese bei spontaner TVT untersucht werden konnte.

Am murinen Stenosemodell mit partieller Flussreduktion konnte bei Mäusen nach orthotoper Implantation humaner Tumoren gezeigt werden, dass TF von pancreatischen Tumorzellen die Koagulationskaskade aktiviert, dies allerdings unabhängig von zirkulierenden TF<sup>+</sup> Mikropartikeln geschieht<sup>162</sup>.

Durch Kombination des venösen Stenosemodells und der i.v. Applikation von tumorösen Mikropartikeln bot sich die Möglichkeit, reproduzierbar die Auswirkung von Mikropartikeln auf die Thrombosierungsneigung zu erforschen sowie weitere Untersuchungen im Hinblick auf Thrombusmorphologie und -zellgehalt einzuleiten, um damit Rückschlüsse auf die Pathogenese ziehen zu können.

Im Organismus tumorkrankter Patienten wirken zahlreiche Mechanismen modulierend auf die Hämostase. In der vorliegenden Arbeit fokussierten wir uns jedoch auf die Tatsache, dass Tumoren Mikropartikel in die Blutbahn abgeben und darüber prokoagulatorisch wirken können<sup>83,84,87,98,110,132-135</sup>. Durch die zweimalige Injektion von jeweils 150 µg Mikropartikel konnten im Stenosemodell reproduzierbar venöse Thromben generiert werden und zwar mit einer Inzidenz von 100 % gegenüber nur ca. 60 % bei Tieren ohne Mikropartikelapplikation. Somit kann hier gezeigt werden, dass mit dem dargestellten Tiermodell die thrombogene Wirkung von Tumormikropartikeln in vivo analysiert werden kann.

Zunächst wurde die thrombogene Wirkung unterschiedlicher Mikropartikeltypen untersucht: Blut-, FG- und L3.6pl-Mikropartikel. Blut-Mikropartikel, isoliert aus dem Blut gesunder humaner Spender, wurden im murinen Stenosemodell getestet, um eine Aussage über die prokoagulativen Eigenschaften von Mikropartikeln an sich treffen zu können. Blut-Mikropartikel finden sich physiologischerweise im Blut eines jeden Individuums und stammen von verschiedenen vaskulären Zellen ab<sup>77-80</sup>, v.a. von Thrombozyten aber auch Erythrozyten, Monozyten, glatten Muskelzellen<sup>79,161</sup>. Im Vergleich zu einer Kontrollgruppe, die einer ste-

nosierenden Operation unterzogen wurde, aber keine Mikropartikel erhielt, war es möglich, eine statistische Äquivalenz nachzuweisen. Dies beweist, dass die i.v. Applikation humaner Blut-Mikropartikel in Mäuse per se keinen prothrombotischen Effekt hat. Zudem lässt sich hieraus schließen, dass Blut-Mikropartikel aus gesunden Spendern keinen anregenden Effekt auf die Phlebothrombogenese haben. Dies ist wahrscheinlich darauf zurückzuführen, dass TF auf Blut-Mikropartikeln in seiner inaktiven Form vorliegt und erst aktiviert werden muss, um seine prothrombotische Wirkung zu entfalten. Daher wurden diese Mikropartikel in den weiteren Untersuchungen als Kontrollgruppe der tumorösen Mikropartikel herangezogen.

Zwei Typen tumoröser Mikropartikel wurden untersucht: FG- und L3.6pl- Mikropartikel, die beide von einer pancreaskarzinomatösen Mutterzelllinie abstammen. Während FG-Mikropartikel sich durch schnelles Wachstum aber geringe Metastasierungsrate auszeichnen, ist schnelles Wachstum sowie eine hohe Metastasierungsrate für L3.6pl-Mikropartikel charakteristisch<sup>146-148</sup>.

Zum einen zeigte sich, dass Tumormikropartikel ein signifikant höheres thrombogenes Potential haben als Blut-Mikropartikel. Zum anderen konnte nachgewiesen werden, dass tumoröse Mikropartikel unabhängig von der Malignität die Gerinnung aktivieren, denn die Thrombusgewichte beider Mikropartikeltypen rangierten in der gleichen Größenordnung. Lediglich die Thrombusinzidenz war bei den L3.6pl-Mikropartikeln etwas höher.

Allerdings wurde durch die Versuche mit Sham-operierten Tieren deutlich, dass die tumorösen Mikropartikel ihre thrombogene Wirkung nur entfalten können, wenn simultan die Blutströmungsgeschwindigkeit reduziert ist.

Im weiteren Verlauf der Studie wurden vorwiegend L3.6pl-Mikropartikel verwendet. Dies liegt darin begründet, dass tiefe Venenthrombosen verstärkt bei Patienten mit hoch malignen, schnell wachsenden und metastasierenden Tumoren, allem voran beim Pancreaskarzinom vorkommen. Alle diese Eigenschaften sind auch den L3.6pl-Zellen, welche die Mikropartikel vesikulieren, zuzuschreiben.



#### **4. DYNAMIK DER THROMBOGENESE**

Die ultrasonographischen Untersuchungen brachten wertvolle Erkenntnisse im Hinblick auf die dynamischen Aspekte der Thrombogenese. Eine deutliche Massenzunahme erfuhr das sich bildende intravasale Gerinnsel jeweils direkt nach den Injektionen. In Folge der ersten Injektion entwickelte sich im Mittel ein Thrombus der Größe von ca. 3 mm, wobei sich die Thrombusmasse in Reaktion auf die zweite Mikropartikelinjektion im Mittel nochmals verdoppelte.

Die Untersuchungen zur Dynamik der Thrombusbildung nach Mikropartikelinjektion zeigen, dass es jeweils innerhalb der ersten 30 min nach Injektion zu einer hochgradigen Aktivierung der Gerinnung mit Bildung eines soliden, sonographisch darstellbaren Thrombus kommt. Schon jeweils eine Stunde nach der ersten bzw. zweiten Mikro-partikelinjektion sind nur noch geringe Schwankungen der Thrombusgröße zu beobachten. Der prothrombotische Effekt der tumorösen Mikropartikel scheint also auf einen sehr kurzen Zeitraum beschränkt. Diese Vermutung wird unterstrichen durch die Tatsache, dass die Messwerte zur Thrombuslänge bei den Mäusen, deren Venae cavae zum regulären Versuchsende nach 48 h entnommen wurden, den Messwerten der letzten sonographischen Aufnahme entsprechen.

Im Gegensatz zu den nicht thrombogenen Blut-Mikropartikel ist eine klare Korrelation von tumorösen Mikropartikeln und Gerinnungsaktivierung nachweisbar.

Wahrscheinlich ist die kurze Wirkdauer der Mikropartikel auf die schnelle Elimination aus dem Blut zurück zu führen. Umso beeindruckender erscheint jedoch die Wucht, mit der sie die Gerinnung zu aktivieren vermögen. Aus den Ergebnissen, die im Zuge dieser Arbeit gewonnenen werden konnten, lässt sich die Hypothese erstellen, dass tumoröse Mikropartikel über die Aktivierung der extrinsischen Koagulationskaskade wirken. Dem mikropartikulären TF kommt dabei eine herausragende Rolle zu. Zelluläre Mechanismen, ausgehend von Thrombozyten und Leukozyten, die für die Stenose-induzierte TVT von grundlegender Bedeutung sind, werden vom prokoagulatorischen Potential der tumorösen Mikropartikel vollständig kaschiert.

## **5. UNABHÄNGIGKEIT DER MIKROPARTIKEL-GETRIGGERTEN VENÖSEN THROMBOSE VON LEUKO- UND THROMBOZYTÄREN EINFLÜSSEN**

In Vorarbeiten der Arbeitsgruppe wurden bereits wichtige molekulare Grundmechanismen der Thrombogenese am venösen Thrombosemodell geklärt. Dabei konnte gezeigt werden, dass die Rekrutierung von Leukozyten und Thrombozyten über P-Selektin bzw. GPIb essentiell für die Phlebothrombogenese sind<sup>24</sup>.

P-Selektin wird von aktivierten Thrombozyten und Endothelzellen exprimiert<sup>18,19,53</sup>. Leukozyten akkumulieren an endotheliale P-Selektin und interagieren mit Thrombozyten über ihren Rezeptor PSGL-1<sup>24,55</sup>. Auch Thrombozyten können über GPIb an endotheliales P-Selektin binden. Desweiteren binden Thrombozyten über GPIb an Leukozyten und bilden mit diesen in der frühen Phase der Thrombusbildung heterotypische Aggregate<sup>44,45</sup>.

In einer kürzlich veröffentlichten Studie konnte gezeigt werden, dass das Fehlen des funktionalen GPIb $\alpha$  Rezeptors bei unbehandelten IL4-R/Iba-Mäusen massive Auswirkungen auf die Thrombogenese im Stenosemodell hatte. Intravitalmikroskopische Aufnahmen belegen, dass 6 h nach Induktion der Flussreduktion adhärente Thrombozyten nur diffus verteilt angetroffen und keine Aggregatbildung beobachtet werden konnte. Ebenso war die Leukozytenadhäsion und die Thrombozyten-Leukozyten-Interaktion sowie die Bildung von NETs signifikant reduziert. Folge war eine stark eingeschränkte Thrombogenese<sup>47</sup>.

Da in Abwesenheit von Tumormikropartikeln die Rekrutierung von Leukozyten und Thrombozyten unabdingbar für die Entstehung von venösen Thrombosen ist, wurde in der vorliegenden Arbeit untersucht, ob diese Zelltypen auch für die durch Tumormikropartikel ausgelöste Thrombose von Bedeutung sind. Um die Rolle des GPIb $\alpha$  Rezeptors bei der Mikropartikel-assoziierten TVT zu untersuchen, wurden Mäuse des Stammes IL4-R/Iba mit Mikropartikeln behandelt. Trotz massiv eingeschränkter Leukozyten-Thrombozyten-Interaktion, einem für die „physiologische“ Thrombusbildung im Stenosemodell unumgänglichen Phänomen, war die Thrombosierungsneigung unbeeinträchtigt.

Da aber die Interaktion von Leukozyten und Blutplättchen nicht nur von GPIb, sondern auch von P-Selektin abhängig ist, wurden P-Selektin-defiziente Mäuse

einer Behandlung mit Mikropartikeln unterzogen und die Thrombosierungsrate und das Thrombusgewicht beurteilt. Bei stenosierte Wildtyp-Tieren ohne zusätzliche Mikropartikelapplikation ist in der Initial-phase der venösen Thrombose im Stenosemodell endotheliales P-Selektin essentiell für die Leukozytenrekrutierung und die Thrombozytenadhärenz. Intravitalmikroskopische Aufnahmen belegen, dass die Leukozytenadhäsion in P-Selektin defizienten Mäusen (SELP<sup>-/-</sup>) fast vollständig unterbunden ist, was in einer signifikant verminderten Thrombosierungsrate resultiert<sup>24</sup>.

Keines der SELP<sup>-/-</sup> Tiere, welches Blut-Mikropartikel nach dem bekannten Schema erhielt, entwickelte einen Thrombus, was darauf hindeutet, dass Blut-Mikropartikel kein prokoagulatives Potential zugesprochen werden kann. Im Gegensatz dazu war aber bei SELP<sup>-/-</sup> Mäusen, die mit L3.6pl- Mikropartikeln behandelt wurden zu beobachten, dass es zu einer massiven Aktivierung des Koagulationssystems kam. Alle Tiere entwickelten voluminöse Thromben, die sich von der Ligaturstelle nach kaudal z.T. bis in die Venae iliacae ausdehnten. Thrombusgewichte und -inzidenz war vergleichbar mit einer Gruppe von C57Bl/6J Mäusen, die ebenfalls L3.6pl-Mikropartikel erhielten. Die Induktion einer venösen Thrombose durch tumoröse Mikropartikel scheint demnach vollständig unabhängig von P-Selektin zu verlaufen.

Zusammengefasst lassen diese Ergebnisse darauf schließen, dass tumoröse Mikropartikel die Thrombusbildung unbeeinflusst von GPIIb/IIIa und P-Selektin induzieren. Dies bedeutet gleichzeitig, dass tumoröse Mikropartikel die Thrombosierung unabhängig von Leukozyten- und Thrombozytenadhäsion sowie -interaktion aktivieren. Ein Beleg dafür konnte in immunhistologischen Präparaten von Mikropartikel-induzierten Thromben erbracht werden. Leukozyten waren im Falle der tumorösen Mikropartikel vorwiegend endothelnah lokalisiert. Im Zentrum des Thrombus konnten nur wenige Leukozyten detektiert werden. Auch Thrombozyten waren im Vergleich mit Blut-Mikropartikel induzierten Thromben vermehrt randständig zu detektieren. Dahingegen konnte anhand der Fibrinogenfärbung der Eindruck gewonnen werden, dass die Hauptmasse der Thromben von Tieren, die tumoröse Mikropartikel erhielten, Fibrin ist, das dicht gepackt, in Schichten gelagert das gesamte Gefäßlumen ausfüllt.

Ob tumoröse Mikropartikel die Thrombosierung nicht nur unabhängig von Rezeptoren vermitteln, die verantwortlich für die Bindung von Zellen an das Endothel sind, sondern auch wirklich unabhängig von Blutzellen, welche TVT hervorrufen, sollte in einem weiteren Schritt geklärt werden. Dafür wurden in unabhängigen Gruppen entweder Thrombozyten oder Neutrophile depletiert. In der eigenen Arbeitsgruppe konnte in der Vergangenheit an unbehandelten Wildtyp-tieren bereits gezeigt werden, dass in den ersten 6 h nach Stenoseinduktion eine massive Leukozytenrekrutierung an das aktivierte Endothel zu beobachten ist. Die Entstehung einer Phlebothrombose kann also als sterile Inflammation interpretiert werden. Das thrombogene Potential von Neutrophilen kann durch verschiedene Mechanismen zur TVT beitragen. Erstens werfen Neutrophile sog. NETs aus, netzartige Strukturen, die auf ihrer Oberfläche prokoagulatorische Mediatoren binden können, deren Interaktion begünstigen und zudem weitere Blutzellen aus dem Blutfluss einfangen können. Neben der NETs-abhängigen Thrombozytenaggregation und die PDI-vermittelte Aktivierung des lokal akkumulierten monozytären TF im Bereich der venösen Stase tragen Neutrophile über NETs zur Aktivierung des FXII und somit zur Anregung des intrinsischen Gerinnungsweges bei<sup>24</sup>. Monozyten hingegen tragen vor allem durch die Bereitstellung von TF durch die akkumulierten Zellen selbst sowie durch monozytäre Mikropartikel bei und aktivieren die Gerinnung vorwiegend über den extrinsischen Weg.

Im Stenosemodell unbehandelter Kontrolltiere konnte bereits gezeigt werden, dass neutrophilendepletierte Mäuse eine signifikant reduzierte Thrombosierungsrate im Vergleich mit isotypbehandelten Mäusen aufweisen<sup>47</sup>.

Im Widerspruch dazu stehen die Ergebnisse der Mikropartikelversuche an neutrophilendepletierten Mäusen. Hier war wiederum eine massive Thrombosierungsneigung mit 100 %iger Thrombusinzidenz zu beobachten. Die Thromben waren zudem außergewöhnlich groß, was auf eine Rolle der neutrophilen Granulozyten bei der Thrombolyse Mikropartikel-induzierter venöser Thromben schließen lässt.

Thrombozyten können auf mehreren Wegen zur Thrombogenese beitragen. Zum einen können aktivierte Thrombozyten über GPIIb lösliches Fibrinogen binden - sie aggregieren<sup>40</sup>. Zum anderen können Plättchen die Thrombinbildung

durch Interaktion mit verschiedenen Koagulationsfaktoren katalysieren. Vor allem durch die Interaktion von FXa, FVa und  $\text{Ca}^{2+}$  mit Phospholipiden auf der Oberfläche aktivierter Plättchen entsteht der sog. Prothrombinasekomplex, der die proteolytische Aktivierung von Prothrombin zu Thrombin zur Folge hat<sup>40</sup>. Weiterhin degranulieren aktivierte Thrombozyten granuläre Proteine wie PDI, eine Protease die als Aktivator von ruhendem TF gilt<sup>75</sup>. Und schließlich können Plättchen die NETosis stimulieren und triggern so auf indirekte Art und Weise die Leukozyten-abhängige Fibrinbildung über Aktivierung des intrinsischen Wegs der Koagulationskaskade<sup>24,59</sup>.

Ähnlich der Abwesenheit von Neutrophilen, hatte auch die Depletion von Thrombozyten keinen Einfluss auf die Mikropartikel-induzierte Thrombosierung. Alle plättchendepletierten Tiere entwickelten einen Thrombus.

Schlussfolgernd kann festgehalten werden, dass tumoröse Mikropartikel im Stenosemodell die Thrombogenese unabhängig von der Rekrutierung von Leukozyten und Thrombozyten triggern. Die im Rahmen der Flussreduktion-induzierten Thrombose entscheidenden zellulären Faktoren werden von tumorösen Mikropartikeln überwältigt und scheinen keinerlei Rolle mehr für die Thrombusbildung zu spielen. Allerdings legen die Versuche zur Neutrophilen-depletion den Verdacht nahe, dass neutrophile Granulozyten einen protektiven Effekt gegen überschießende Gerinnung haben. Bei Entfernung der Neutrophilen aus der Blutbahn war das Gewicht der entnommenen Thromben merklich erhöht im Vergleich zur Isotypenkohorte.

## **6. INDUKTION DER VENÖSEN THROMBOSE DURCH TF AUS TUMOR- MIKROPARTIKELN**

Welcher Mechanismus der Gerinnungsaktivierung unter Umgehung der zellulären Mechanismen zu Grunde liegt ist noch unklar. Bisher existieren noch keine wissenschaftlichen Berichte über die Wirkung tumoröser Mikropartikel auf die venöse Thrombogenese in vivo. Welcher Weg der Koagulationskaskade durch diese Mikropartikel primär angeregt wird ist ebenso unbekannt.

Die Blutgerinnung lässt sich in zwei Wege unterteilen, deren letzte Schritte identisch verlaufen. Der extrinsische Weg wird durch Kontakt von TF mit im Blut

zirkulierendem FVII aktiviert. Startpunkt des intrinsischen Weges ist die autokatalytische Aktivierung von FXII zu FXIIa. Beide Wege münden in die Konvertierung von FX zu FXa. Der gemeinsame Weg gipfelt letztlich in der Bildung von Fibrin<sup>2</sup>.

Ob tumoröse Mikropartikel explizit über den intrinsischen Gerinnungsweg wirken sollte durch Inhibition des FXII erprobt werden, der den intrinsischen Weg der Koagulationskaskade aktiviert. Die Mikropartikel-induzierte Thrombogenese konnte allerdings nicht durch die Inhibition des FXII beeinflusst werden. Alle Tiere dieser Versuchsgruppe entwickelten Thromben, die mit einer Kontrollkohorte, die nur NaCl i.v. erhielten, auch im Hinblick auf das Thrombusgewicht vergleichbar waren. Dies deutet darauf hin, dass tumoröse Mikropartikel primär nicht über den intrinsischen Weg aktivierend auf die Koagulationskaskade wirken.

TF, der als Initiator der extrinsischen Gerinnung fungiert<sup>102,103,105,163</sup>, wird konstitutiv von Zellen der Media und Adventitia exprimiert<sup>64,92</sup>, aber auch auf einigen endovaskulären Zellen wie Leukozyten, Endothelzellen<sup>63,65,95-97</sup> und auch auf Mikropartikeln<sup>22,98,99</sup>. Dem Protein TF, allem voran dem endovaskulären TF, wird eine herausragender Bedeutung für die Initiierung und Progression der Thrombusbildung zugesprochen und es konnte bereits belegt werden, dass eine TF-Defizienz bzw. Funktionsverlust zur massiven Reduktion der Thrombusbildung beiträgt<sup>24,98,114,115</sup>.

Bei Blutanalysen von Tumorpatienten mit malignen Tumoren sind tumoröse Mikropartikel, die aktivierten TF auf ihrer Oberfläche tragen, nachweisbar<sup>110,121,131,132</sup>. Die Werte an TF<sup>+</sup> Mikropartikeln sind bei Patienten mit Pankreaskarzinom besonders hoch (68 % positiv)<sup>134</sup>.

Durch die Kombination von Flussverlangsamung und i.v. Applikation tumoröser Mikropartikel in einen lebenden Organismus bot sich die Möglichkeit, gezielt den Effekt von tumorassoziertem TF auf die Thrombogenese zu untersuchen.

Da bereits endogene TF<sup>+</sup> Mikropartikel, die von myeloiden Zellen abstammen, Einfluss auf die Stenose-induzierte Thrombogenese nehmen und ein um ca. 60 % reduziertes Thrombusgewicht bei einer 61,7 %igen Thrombusinzidenz zur Folge hatten<sup>24</sup>, wurde zunächst an TF<sup>fl/fl</sup> LysM Cre Tieren beurteilt, ob ein Man-

gel an myeloidem TF die Entstehung eines Thrombus nach Injektion von Mikropartikeln beeinflusst. Diese Tiere entwickelten durchweg alle einen Thrombus. Dennoch war auffällig, dass das mittlere Thrombusgewicht der Cre<sup>+</sup> Mäuse gegenüber der Kontrollgruppe aus Cre<sup>-</sup> Mäusen um ca. 25 % verringert war. Der Mangel an endogenen, myeloiden TF<sup>+</sup> Mikropartikeln scheint also gegenüber der exogenen tumorösen Mikropartikel eine untergeordnete Rolle zu spielen.

Letztlich wurde versucht, den mikropartikulären TF vor Applikation der Mikropartikel durch Inkubation mit einem gegen diesen Antigen gerichteten Antikörper zu blockieren. Und tatsächlich war zu beobachten, dass Mäuse, die Antikörper-behandelte Mikropartikel erhielten, im Gegensatz zu jenen, die mit Isotyp-inkubierten Mikropartikeln behandelt wurden, signifikant kleinere Thromben bei verminderter Thrombusinzidenz entwickelten. Schlussfolgernd lässt sich sagen, dass tumorassoziierter TF auf Mikropartikeln die Thrombosierungsneigung in vivo also maßgeblich beeinflusst. Die Vermutung liegt nahe, dass tumoröse Mikropartikel über das Protein TF, welches sie in aktiver Form auf ihrer Oberfläche tragen, die extrinsische Gerinnungskaskade aktivieren. Folge ist die massive Bildung von Fibrin unabhängig von thrombozytären und leukozytären Einflüssen.

Aus den Ergebnissen, die im Zuge dieser Arbeit gewonnenen werden konnten, lässt sich die Hypothese erstellen, dass tumoröse Mikropartikel über die Aktivierung der extrinsischen Koagulationskaskade wirken. Dem mikropartikulärem TF kommt dabei eine herausragende Rolle zu. Zelluläre Mechanismen, ausgehend von Thrombozyten und Leukozyten, die für die Stenose-induzierte TVT von grundlegender Bedeutung sind, werden vom prokoagulatorischen Potential der tumorösen Mikropartikel vollständig kaschiert.

## VII. ZUSAMMENFASSUNG

In dieser Arbeit wurde zum ersten Mal der Einfluss tumoröser Mikropartikel auf die Ausbildung venöser Thrombosen im chronischen Stenosemodell *in vivo* beschrieben. Ziel dieser Studie war es zu beurteilen, ob und wie Mikropartikel die Gerinnung beeinflussen.

Es konnte gezeigt werden, dass physiologischerweise im humanen Blut vorkommende Mikropartikel die Gerinnungsneigung im murinen Organismus nicht beeinflussen. Demgegenüber stehen die Resultate der Versuche mit Mikropartikeln, die von Tumorzellen abstammen. Tumoröse Mikropartikel führen nach *i.v.* Applikation zu einer hochgradigen Aktivierung der Koagulationskaskade mit massiver Fibrinbildung. Allerdings ist das prothrombogene Potential der tumorösen Mikropartikel nur in Abhängigkeit veränderter Hämodynamik zu beobachten, was im Stenosemodell durch Ligatur der Vena cava caudalis mit partieller Flussreduktion gegeben ist. Tumoröse Mikropartikel haben, unabhängig von neutrophilen und thrombozytären Einflüssen, die im Rahmen der Stenose-induzierten tiefen Venenthrombose von essentieller Bedeutung für die Thrombogenese sind, eine massive Aktivierung der Gerinnungskaskade zur Folge. Weder der Knockout relevanter Proteine wie P-Selektin, GPIb oder myeloidem TF, noch die vollständige Elimination von Neutrophilen und Thrombozyten aus der Blutbahn durch pharmakologische Depletion konnte die Mikropartikel-induzierte Thrombosierung eindämmen. Ebenso konnte bewiesen werden, dass tumoröse Mikropartikel nicht über den intrinsischen Weg der Gerinnungskaskade agieren, sondern durch das Protein TF den extrinsischen Weg aktiviert.

Damit kann in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die Pathogenese der venösen Thrombose maßgeblich von der Grunderkrankung abhängig ist. Aus diesem verbesserten Verständnis der venösen Thrombose könnten sich neue Therapieansätze ableiten lassen, die kontextspezifische Auslösefaktoren miteinbeziehen.



## VIII. SUMMARY

### **The impact of tumorous microparticles on the onset of deep venous thrombosis in a murine stenosis model**

In this study the impact of tumorous microparticles on the onset of deep venous thrombosis in the murine stenosis model was described. Aim of the study was to evaluate the mechanism how microparticles modulate the coagulation in vivo.

It was shown that microparticles, which can be isolated from the blood of healthy human donors, have no influence on the coagulation in mice. In contrast, microparticles, that are shed by pancreatic tumor cells, have a massive impact on the activation of the coagulation cascade after i.v. application. The prothrombotic effect of tumorous microparticles can only be seen in course of a reduced venous blood flow, but not in sham operated animals. In the stenosis model blood flow in the vena cava caudalis is reduced due to the ligation of the vessel. Independently of neutrophil and thrombocytic influences, that are essential in face of the stenosis-induced thrombogenesis, tumorous microparticles activate the coagulation cascade in mice. Neither the knockout of P-selectin, GPIIb or myeloid tissue factor nor the complete elimination of neutrophils or platelets by depletion can stop the microparticle-induced thrombosis. Furthermore, it was possible to show, that tumorous microparticles don't activate the intrinsic pathway of the coagulation system, but the extrinsic pathway via tissue factor.

In this study we were able to show, that the pathogenesis of venous thrombosis depends on the underlying disease. The knowledge we gained in course of this study concerning microparticle-induced venous thrombosis contributes vastly to the understanding of tumor associated thrombogenesis and may be the start-point of the development of new therapy strategies.

## IX. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

|                   |  |                 |  |
|-------------------|--|-----------------|--|
| Abb.              | Abbildung  | h               | Stunde                                   |
| BSA               | Bovines Serumalbumin                                 | ICAM-1          | Intercellular Adhesion Molecule 1        |
| bzw.              | beziehungsweise                                      | IgG             | Immunglobulin G                          |
| ° C               | Grad Celsius   | i.p.            | intraperitoneal                          |
| ca.               | circa  | i.v.            | intravenös                               |
| CCD-Kamera        | Charged Coupled Device-Kamera                        | IVC             | Individuell ventilerter Käfig            |
| CD                | Cluster of Differentiation                           | kDa             | Kilodalton                               |
| cm                | Zentimeter   | Kg              | Kilogramm                                |
| DAPI              | 4',6-Diamidino-2-phenylindole                        | kHz             | Kilohertz                                |
| DCF               | 5-(and-6)-carboxy-2',7'-dichlorofluorescein diacetat | LFA-1           | Lymphocyte function-associated antigen 1 |
| d.h.              | das heißt  | m               | männlich                                 |
| DNS               | Desoxyribonukleinsäure                               | MAC-1           | Macrophage antigen complex 1             |
| dsDNS             | doppelsträngige DNS                                  | MHz             | Megahertz                                |
| etc.              | Et cetera  | mg              | Milligramm                               |
| F                 | Faktor   | min             | Minute                                   |
| FeCl <sub>3</sub> | Eisen-3-Chlorid                                      | ml              | Milliliter                               |
| FG-MP             | Fast-Growing Mikropartikel                           | mM              | Millimolar                               |
| GABA              | Gamma-aminobutyric acid                              | mm              | Millimeter                               |
| g                 | Gramm  | mm <sup>2</sup> | Quadratmillimeter                        |
| xg                | x-faches der Erdbeschleunigung                       | mm/s            | Millimeter in der Sekunde                |
| GP                | Glykoprotein   | MP              | Mikropartikel                            |
|                   |  | µAmp            | Mikroampère                              |

|                 |  |      |                      |
|-----------------|--|------|----------------------|
| µg              | Mikrogramm                             | WPB  | Weibel Palade Bodies |
| µm              | Mikrometer                             | z.B. | zum Beispiel         |
| µm <sup>2</sup> | Quadratmikrometer                      |      |                      |
| µl              | Mikroliter                             |      |                      |
| NaCl            | Natriumchlorid(lösung)                 |      |                      |
| NET             | Neutrophil extracelluar<br>Trap        |      |                      |
| nm              | Nanometer                              |      |                      |
| PBS             | Phosphat buffered sali-<br>ne          |      |                      |
| PCK             | H-D-Pro-Phe-Arg-<br>chloromethylketone |      |                      |
| PDI             | Phosphodiisomerase                     |      |                      |
| PE              | Pulmonäre Emboli                       |      |                      |
| PSGL-1          | P-Selectin Glycoprotein<br>Ligand 1    |      |                      |
| Rpm             | Rounds per minute                      |      |                      |
| s               | Sekunde                                |      |                      |
| SMC             | Smooth muscle cell                     |      |                      |
| sog.            | sogenannt                              |      |                      |
| Tab.            | Tabelle                                |      |                      |
| TF              | Tissue Factor                          |      |                      |
| TVT             | Tiefe Venenthrombose                   |      |                      |
| VCAM-1          | Vascular cell adhesion<br>molecule 1   |      |                      |
| VLA-4           | Very Late Antigen-4                    |      |                      |
| VTE             | Venöse Thromboembo-<br>lie             |      |                      |
| vWF             | von Willebrand-Faktor                  |      |                      |
| w               | weiblich                               |      |                      |
| Wo              | Woche                                  |      |                      |

## X. ABBILDUNGSVERZEICHNIS

- Abbildung 1: Wandschichtung einer Vene
- Abbildung 2: makro- und mikroskopische Ansicht eines murinen Thrombus 48 h nach Ligatur
- Abbildung 3: Adhäsionskaskade von Leukozyten nach <sup>55</sup>
- Abbildung 4: Schematische Darstellung eines Mikropartikels
- Abbildung 5: Schematische Darstellung der Koagulationskaskade
- Abbildung 6: Aktivierung von TF durch PDI
- Abbildung 7: Strukturformel von DCF
- Abbildung 8: Zeitlicher Verlauf des chronischen Versuchs
- Abbildung 9: OP-Schritte zur Stenosierung der Vena cava caudalis
- Abbildung 10: OP-Schritte der Sham-Operation
- Abbildung 11: OP-Schritte zur Entnahme der Vena cava caudalis
- Abbildung 12: Strukturformel von PCK
- Abbildung 13: Darstellung des Strahlengangs im Epifluoreszenzmikroskop
- Abbildung 14: Strukturformel von Acridin-Orange
- Abbildung 15: Vergleich der Flussgeschwindigkeit vor und nach Stenosierung der Vena cava caudalis
- Abbildung 16: Thrombusgewicht im Stenosemodell
- Abbildung 17: Immunhistologische Färbungen zur Beurteilung von Zellgehalt und Zellverteilung in einem Blut-Mikropartikel induzierten Thrombus
- Abbildung 18: Immunhistologische Färbungen zur Beurteilung von Zellgehalt und Zellverteilung in einem FG-Mikropartikel induzierten Thrombus
- Abbildung 19: Immunhistologische Färbungen zur Beurteilung von Zellgehalt und Zellverteilung in einem L3.6pl-Mikropartikel induzierten Thrombus

- Abbildung 20: Einfluss von Mikropartikeln auf die Stenose-induzierte venöse Thrombose
- Abbildung 21: Einfluss von P-Selektin auf die Mikropartikel-getriggerte venöse Thrombose
- Abbildung 22: Einfluss des thrombozytären GPIb auf die Mikropartikel-induzierte venöse Thrombose
- Abbildung 23: Einfluss des myeloiden TF auf die Mikropartikel-induzierte venöse Thrombose
- Abbildung 24: Einfluss der Thrombozytendepletion auf die Mikropartikel-induzierte venöse Thrombose
- Abbildung 25: Einfluss der Neutrophilendepletion auf die Mikropartikel-induzierte venöse Thrombose
- Abbildung 26: Einfluss des FXII auf die Mikropartikel-induzierte venöse Thrombose
- Abbildung 27: Einfluss der mikropartikulären TF auf die Mikropartikel-induzierte venöse Thrombose
- Abbildung 28: CT Aufnahmen im Sagittalschnitt
- Abbildung 29: Ultraschallbefunde 0 min nach und 3 h nach der 1. Mikropartikelinjektion sowie entnommener Thrombus makroskopisch
- Abbildung 30: Ultraschallbefunde 4,5 h nach und 7 h nach der 1. Mikropartikelinjektion sowie entnommener Thrombus makroskopisch
- Abbildung 31: Ultraschallbefunde 0 min nach und 3 h nach der 2. Mikropartikelinjektion sowie entnommener Thrombus makroskopisch
- Abbildung 32: Graphische Darstellung der Entwicklung von Thrombuslänge und Thrombusfläche in Abhängigkeit vom Zeitverlauf nach Mikropartikelinjektion

## **XI. TABELLENVERZEICHNIS**

|             |  |
|-------------|--|
| Tabelle 1:  | Dosierung der vollständig antagonisierbaren Narkose bei der Maus   |
| Tabelle 2:  | Dosierung der Antagonisten zur vollständig antagonisierbaren Narkose bei der Maus                                    |
| Tabelle 3:  | Antikörper zur immunhistologischen Leukozytenfärbung   |
| Tabelle 4:  | Antikörper zur immunhistologischen Neutrophilenfärbung   |
| Tabelle 5:  | Antikörper zur immunhistologischen Thrombozytenfärbung   |
| Tabelle 6:  | Antikörper zur immunhistologischen Fibrinogenfärbung   |
| Tabelle 7:  | Tiere für die Standardisierung des venösen Stenosemodells  |
| Tabelle 8:  | Tiere für die Mikropartikel-getriggerte venöse Stenose   |
| Tabelle 9:  | Tiere der Knockout-Stämme für die venöse Stenose   |
| Tabelle 10: | Tiere für die Thrombozytendepletion  |
| Tabelle 11: | Tiere für die Neutrophilendepletion  |
| Tabelle 12: | Tiere für die Untersuchungen zur Rolle des intrinsischen Systems   |
| Tabelle 13: | Tiere für die Untersuchungen zur Rolle von mikropartikulärem TF  |
| Tabelle 14: | Tierzahl für die CT-Untersuchungen   |
| Tabelle 15: | Tierzahl für die Dynamikbeurteilung durch Ultraschall  |
| Tabelle 16: | Dynamik der L3.6pl-induzierten Thrombogenese nach der 1. / 2. Mikropartikelinjektion mit sofortiger Thrombusentnahme |
| Tabelle 17: | Dynamik der L3.6pl-induzierten Thrombogenese in der 1.-3. h nach der 2. Injektion                                    |

## XII. LITERATURVERZEICHNIS

1. Trousseau, A. Phlegmasia alba dolens. in *Clinique Medicale de l'Hotel-Dieu de Paris* (ed. Fils, J.B.e.) (Paris, 1865).
2. Engelhardt, W. & Breves, G. Physiologie der Haustiere, (MVS Medizinverlage Stuttgart, 2005).
3. Hees, H. & Sinowatz, F. Kurzlehrbuch der Zytologie und mikroskopischen Anatomie, (Deutscher Ärzte-Verlag, 2000).
4. Esmon, C.T. Basic mechanisms and pathogenesis of venous thrombosis. *Blood Rev* 23, 225-229 (2009).
5. Virchow, R. Gesammelte Abhandlungen zur wissenschaftlichen Medicin, (1856).
6. Egeberg, O. Inherited Antithrombin Deficiency Causing Thrombophilia. *Thromb Diath Haemorrh* 13, 516-530 (1965).
7. Allaart, C.F., *et al.* Increased risk of venous thrombosis in carriers of hereditary protein C deficiency defect. *Lancet* 341, 134-138 (1993).
8. Rosendaal, F.R., Koster, T., Vandenbroucke, J.P. & Reitsma, P.H. High risk of thrombosis in patients homozygous for factor V Leiden (activated protein C resistance). *Blood* 85, 1504-1508 (1995).
9. Margaglione, M., *et al.* Increased risk for venous thrombosis in carriers of the prothrombin G-->A20210 gene variant. *Ann Intern Med* 129, 89-93 (1998).
10. Sevitt, S. The structure and growth of valve-pocket thrombi in femoral veins. *J Clin Pathol* 27, 517-528 (1974).
11. Koellnberger, M. In vivo Analyse der zellulären und molekularen Mechanismen der arteriellen und venösen Thrombose in der Maus. Dissertation. München 2007.
12. Pottier, P., *et al.* Immobilization and the risk of venous thromboembolism. A meta-analysis on epidemiological studies. *Thromb Res* 124, 468-476 (2009).
13. Jorgensen, P.S., *et al.* Low molecular weight heparin (Innohep) as thromboprophylaxis in outpatients with a plaster cast: a venographic controlled study. *Thromb Res* 105, 477-480 (2002).
14. Cannegieter, S.C., Doggen, C.J., van Houwelingen, H.C. & Rosendaal, F.R. Travel-related venous thrombosis: results from a large population-

- based case control study (MEGA study). PLoS Med 3, e307 (2006).
15. Warlow, C., Ogston, D. & Douglas, A.S. Deep venous thrombosis of the legs after strokes. Part I--incidence and predisposing factors. Br Med J 1, 1178-1181 (1976).
  16. Brooks, E.G., *et al.* Valves of the deep venous system: an overlooked risk factor. Blood 114, 1276-1279 (2009).
  17. Aird, W.C. Vascular bed-specific thrombosis. J Thromb Haemost 5 Suppl 1, 283-291 (2007).
  18. Lawson, C.A., *et al.* Monocytes and tissue factor promote thrombosis in a murine model of oxygen deprivation. J Clin Invest 99, 1729-1738 (1997).
  19. Pinsky, D.J., *et al.* Hypoxia-induced exocytosis of endothelial cell Weibel-Palade bodies. A mechanism for rapid neutrophil recruitment after cardiac preservation. J Clin Invest 97, 493-500 (1996).
  20. Closse, C., *et al.* Influence of hypoxia and hypoxia-reoxygenation on endothelial P-selectin expression. Thromb Res 85, 159-164 (1997).
  21. Zhou, J., May, L., Liao, P., Gross, P.L. & Weitz, J.I. Inferior vena cava ligation rapidly induces tissue factor expression and venous thrombosis in rats. Arterioscler Thromb Vasc Biol 29, 863-869 (2009).
  22. Falati, S., *et al.* Accumulation of tissue factor into developing thrombi in vivo is dependent upon microparticle P-selectin glycoprotein ligand 1 and platelet P-selectin. J Exp Med 197, 1585-1598 (2003).
  23. Brill, A., *et al.* von Willebrand factor-mediated platelet adhesion is critical for deep vein thrombosis in mouse models. Blood 117, 1400-1407 (2011).
  24. von Bruhl, M.L., *et al.* Monocytes, neutrophils, and platelets cooperate to initiate and propagate venous thrombosis in mice in vivo. J Exp Med 209, 819-835 (2012).
  25. Kurz, K.D., Main, B.W. & Sandusky, G.E. Rat model of arterial thrombosis induced by ferric chloride. Thromb Res 60, 269-280 (1990).
  26. Diaz, J.A., *et al.* Critical review of mouse models of venous thrombosis. Arterioscler Thromb Vasc Biol 32, 556-562 (2012).
  27. Day, S.M., Reeve, J.L., Myers, D.D. & Fay, W.P. Murine thrombosis models. Thromb Haemost 92, 486-494 (2004).
  28. Myers, D.D., *et al.* P-selectin and leukocyte microparticles are associated with venous thrombogenesis. J Vasc Surg 38, 1075-1089 (2003).
  29. Diaz, J.A., *et al.* Electrolytic inferior vena cava model (EIM) of venous thrombosis. J Vis Exp, e2737 (2011).



30. Heit, J.A., *et al.* The epidemiology of venous thromboembolism in the community. *Thromb Haemost* 86, 452-463 (2001).
31. Silverstein, M.D., *et al.* Trends in the incidence of deep vein thrombosis and pulmonary embolism: a 25-year population-based study. *Arch Intern Med* 158, 585-593 (1998).
32. Abdollahi, M., Cushman, M. & Rosendaal, F.R. Obesity: risk of venous thrombosis and the interaction with coagulation factor levels and oral contraceptive use. *Thromb Haemost* 89, 493-498 (2003).
33. Samama, M.M. An epidemiologic study of risk factors for deep vein thrombosis in medical outpatients: the Sirius study. *Arch Intern Med* 160, 3415-3420 (2000).
34. Cushman, M. Epidemiology and risk factors for venous thrombosis. *Semin Hematol* 44, 62-69 (2007).
35. Eekhoff, E.M., Rosendaal, F.R. & Vandenbroucke, J.P. Minor events and the risk of deep venous thrombosis. *Thromb Haemost* 83, 408-411 (2000).
36. Cushman, M., *et al.* Deep vein thrombosis and pulmonary embolism in two cohorts: the longitudinal investigation of thromboembolism etiology. *Am J Med* 117, 19-25 (2004).
37. Asbeutah, A.M., Riha, A.Z., Cameron, J.D. & McGrath, B.P. Five-year outcome study of deep vein thrombosis in the lower limbs. *J Vasc Surg* 40, 1184-1189 (2004).
38. Prandoni, P., *et al.* The long-term clinical course of acute deep venous thrombosis. *Ann Intern Med* 125, 1-7 (1996).
39. Kahn, S.R. & Ginsberg, J.S. The post-thrombotic syndrome: current knowledge, controversies, and directions for future research. *Blood Rev* 16, 155-165 (2002).
40. Gawaz, M. *Blood platelets*, (Thieme Verlag, 2001).
41. Andre, P., *et al.* Platelets adhere to and translocate on von Willebrand factor presented by endothelium in stimulated veins. *Blood* 96, 3322-3328 (2000).
42. Fujimura, Y., *et al.* von Willebrand factor. A reduced and alkylated 52/48-kDa fragment beginning at amino acid residue 449 contains the domain interacting with platelet glycoprotein Ib. *J Biol Chem* 261, 381-385 (1986).
43. Simon, D.I., *et al.* Platelet glycoprotein Ib $\alpha$  is a counterreceptor for the leukocyte integrin Mac-1 (CD11b/CD18). *J Exp Med* 192, 193-204 (2000).

44. Romo, G.M., *et al.* The glycoprotein Ib-IX-V complex is a platelet counterreceptor for P-selectin. *J Exp Med* 190, 803-814 (1999).
45. Berndt, M.C., Shen, Y., Dopheide, S.M., Gardiner, E.E. & Andrews, R.K. The vascular biology of the glycoprotein Ib-IX-V complex. *Thromb Haemost* 86, 178-188 (2001).
46. Andrews, R.K., Lopez, J.A. & Berndt, M.C. Molecular mechanisms of platelet adhesion and activation. *Int J Biochem Cell Biol* 29, 91-105 (1997).
47. Chandraratne, S. Rolle der Neutrophil Extracellular Traps (NETs) bei der Entstehung der venösen Thrombose. Dissertation. München 2012.
48. Ley, K. The role of selectins in inflammation and disease. *Trends Mol Med* 9, 263-268 (2003).
49. Moore, K.L., *et al.* P-selectin glycoprotein ligand-1 mediates rolling of human neutrophils on P-selectin. *J Cell Biol* 128, 661-671 (1995).
50. Norgard, K.E., *et al.* Characterization of a specific ligand for P-selectin on myeloid cells. A minor glycoprotein with sialylated O-linked oligosaccharides. *J Biol Chem* 268, 12764-12774 (1993).
51. Yang, J., *et al.* Targeted gene disruption demonstrates that P-selectin glycoprotein ligand 1 (PSGL-1) is required for P-selectin-mediated but not E-selectin-mediated neutrophil rolling and migration. *J Exp Med* 190, 1769-1782 (1999).
52. Frenette, P.S., *et al.* P-Selectin glycoprotein ligand 1 (PSGL-1) is expressed on platelets and can mediate platelet-endothelial interactions in vivo. *J Exp Med* 191, 1413-1422 (2000).
53. McEver, R.P. Adhesive interactions of leukocytes, platelets, and the vessel wall during hemostasis and inflammation. *Thromb Haemost* 86, 746-756 (2001).
54. McEver, R.P., Beckstead, J.H., Moore, K.L., Marshall-Carlson, L. & Bainton, D.F. GMP-140, a platelet alpha-granule membrane protein, is also synthesized by vascular endothelial cells and is localized in Weibel-Palade bodies. *J Clin Invest* 84, 92-99 (1989).
55. Ley, K., Laudanna, C., Cybulsky, M.I. & Nourshargh, S. Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. *Nat Rev Immunol* 7, 678-689 (2007).
56. Subramaniam, M., *et al.* Reduced recruitment of inflammatory cells in a contact hypersensitivity response in P-selectin-deficient mice. *J Exp Med* 181, 2277-2282 (1995).
57. Steinhart, A.C. Die Rolle von Leukozyten in der Entstehung der venösen Thrombose - in vivo Untersuchungen im Mausmodell. Dissertation.

München 2012.

58. Brighton, T.A., *et al.* Low-dose aspirin for preventing recurrent venous thromboembolism. *N Engl J Med* 367, 1979-1987 (2012).
59. Clark, S.R., *et al.* Platelet TLR4 activates neutrophil extracellular traps to ensnare bacteria in septic blood. *Nat Med* 13, 463-469 (2007).
60. Butcher, E.C. Leukocyte-endothelial cell recognition: three (or more) steps to specificity and diversity. *Cell* 67, 1033-1036 (1991).
61. Roitt, I., Brostoff, J. & Male, D. Kurzes Lehrbuch der Immunologie, (Thieme, Stuttgart, 1995).
62. Egorina, E.M., Sovershaev, M.A. & Osterud, B. Regulation of tissue factor procoagulant activity by post-translational modifications. *Thromb Res* 122, 831-837 (2008).
63. Butenas, S., Bouchard, B.A., Brummel-Ziedins, K.E., Parhami-Seren, B. & Mann, K.G. Tissue factor activity in whole blood. *Blood* 105, 2764-2770 (2005).
64. Drake, T.A., Morrissey, J.H. & Edgington, T.S. Selective cellular expression of tissue factor in human tissues. Implications for disorders of hemostasis and thrombosis. *Am J Pathol* 134, 1087-1097 (1989).
65. Egorina, E.M., *et al.* Intracellular and surface distribution of monocyte tissue factor: application to intersubject variability. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 25, 1493-1498 (2005).
66. Falati, S., Gross, P., Merrill-Skoloff, G., Furie, B.C. & Furie, B. Real-time in vivo imaging of platelets, tissue factor and fibrin during arterial thrombus formation in the mouse. *Nat Med* 8, 1175-1181 (2002).
67. Ritis, K., *et al.* A novel C5a receptor-tissue factor cross-talk in neutrophils links innate immunity to coagulation pathways. *J Immunol* 177, 4794-4802 (2006).
68. Darbousset, R., *et al.* Tissue factor-positive neutrophils bind to injured endothelial wall and initiate thrombus formation. *Blood* 120, 2133-2143 (2012).
69. Todoroki, H., *et al.* Neutrophils express tissue factor in a monkey model of sepsis. *Surgery* 127, 209-216 (2000).
70. Egorina, E.M., Sovershaev, M.A., Olsen, J.O. & Osterud, B. Granulocytes do not express but acquire monocyte-derived tissue factor in whole blood: evidence for a direct transfer. *Blood* 111, 1208-1216 (2008).
71. Esmon, C.T. Crosstalk between inflammation and thrombosis. *Maturitas* 61, 122-131 (2008).

72. Wakefield, T.W., *et al.* Venous thrombosis-associated inflammation and attenuation with neutralizing antibodies to cytokines and adhesion molecules. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 15, 258-268 (1995).
73. Del Conde, I., Shrimpton, C.N., Thiagarajan, P. & Lopez, J.A. Tissue-factor-bearing microvesicles arise from lipid rafts and fuse with activated platelets to initiate coagulation. *Blood* 106, 1604-1611 (2005).
74. Fuchs, T.A., *et al.* Extracellular DNA traps promote thrombosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 15880-15885 (2010).
75. Reinhardt, C., *et al.* Protein disulfide isomerase acts as an injury response signal that enhances fibrin generation via tissue factor activation. *J Clin Invest* 118, 1110-1122 (2008).
76. Griep, M.A., Fujikawa, K. & Nelsestuen, G.L. Binding and activation properties of human factor XII, prekallikrein, and derived peptides with acidic lipid vesicles. *Biochemistry* 24, 4124-4130 (1985).
77. Castellana, D., Kunzelmann, C. & Freyssinet, J.M. Pathophysiologic significance of procoagulant microvesicles in cancer disease and progression. *Hamostaseologie* 29, 51-57 (2009).
78. Mause, S.F. & Weber, C. Microparticles: protagonists of a novel communication network for intercellular information exchange. *Circ Res* 107, 1047-1057 (2010).
79. Freyssinet, J.M. Cellular microparticles: what are they bad or good for? *J Thromb Haemost* 1, 1655-1662 (2003).
80. Thaler, J., Ay, C. & Pabinger, I. Clinical significance of circulating microparticles for venous thromboembolism in cancer patients. *Hamostaseologie* 32, 127-131 (2012).
81. Gelderman, M.P. & Simak, J. Flow cytometric analysis of cell membrane microparticles. *Methods Mol Biol* 484, 79-93 (2008).
82. Leroyer, A.S., *et al.* Cellular origins and thrombogenic activity of microparticles isolated from human atherosclerotic plaques. *J Am Coll Cardiol* 49, 772-777 (2007).
83. Burnier, L., Fontana, P., Kwak, B.R. & Angelillo-Scherrer, A. Cell-derived microparticles in haemostasis and vascular medicine. *Thromb Haemost* 101, 439-451 (2009).
84. Morel, O., *et al.* Procoagulant microparticles: disrupting the vascular homeostasis equation? *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 26, 2594-2604 (2006).
85. Aras, O., *et al.* Induction of microparticle- and cell-associated intravascular tissue factor in human endotoxemia. *Blood* 103, 4545-4553 (2004).

86. Khorana, A.A., *et al.* Plasma tissue factor may be predictive of venous thromboembolism in pancreatic cancer. *J Thromb Haemost* 6, 1983-1985 (2008).
87. Tesselaar, M.E., *et al.* Microparticle-associated tissue factor activity: a link between cancer and thrombosis? *J Thromb Haemost* 5, 520-527 (2007).
88. Hoffman, M., Whinna, H.C. & Monroe, D.M. Circulating tissue factor accumulates in thrombi, but not in hemostatic plugs. *J Thromb Haemost* 4, 2092-2093 (2006).
89. Bouchard, B.A., Mann, K.G. & Butenas, S. No evidence for tissue factor on platelets. *Blood* 116, 854-855 (2010).
90. Osterud, B. Tissue factor expression in blood cells. *Thromb Res* 125 Suppl 1, S31-34 (2010).
91. Pawlinski, R., *et al.* Hematopoietic and nonhematopoietic cell tissue factor activates the coagulation cascade in endotoxemic mice. *Blood* 116, 806-814 (2010).
92. Morrissey, J.H., Fakhrai, H. & Edgington, T.S. Molecular cloning of the cDNA for tissue factor, the cellular receptor for the initiation of the coagulation protease cascade. *Cell* 50, 129-135 (1987).
93. Spicer, E.K., *et al.* Isolation of cDNA clones coding for human tissue factor: primary structure of the protein and cDNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84, 5148-5152 (1987).
94. Fleck, R.A., Rao, L.V., Rapaport, S.I. & Varki, N. Localization of human tissue factor antigen by immunostaining with monospecific, polyclonal anti-human tissue factor antibody. *Thromb Res* 59, 421-437 (1990).
95. Celi, A., *et al.* P-selectin induces the expression of tissue factor on monocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 8767-8771 (1994).
96. Osterud, B. & Bjorklid, E. Sources of tissue factor. *Semin Thromb Hemost* 32, 11-23 (2006).
97. Pawlinski, R., *et al.* Role of tissue factor and protease-activated receptors in a mouse model of endotoxemia. *Blood* 103, 1342-1347 (2004).
98. Giesen, P.L., *et al.* Blood-borne tissue factor: another view of thrombosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 2311-2315 (1999).
99. Reinhardt, C. New locations of intravascular tissue factor: indications. *Hamostaseologie* 27, 55-58 (2007).
100. Bromberg, M.E., Konigsberg, W.H., Madison, J.F., Pawashe, A. & Garen, A. Tissue factor promotes melanoma metastasis by a pathway

- independent of blood coagulation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 8205-8209 (1995).
101. Riewald, M. & Ruf, W. Mechanistic coupling of protease signaling and initiation of coagulation by tissue factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 7742-7747 (2001).
  102. Bach, R.R. Initiation of coagulation by tissue factor. *CRC Crit Rev Biochem* 23, 339-368 (1988).
  103. Furie, B. & Furie, B.C. Mechanisms of thrombus formation. *N Engl J Med* 359, 938-949 (2008).
  104. Mackman, N., Tilley, R.E. & Key, N.S. Role of the extrinsic pathway of blood coagulation in hemostasis and thrombosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 27, 1687-1693 (2007).
  105. Nemerson, Y. Tissue factor and hemostasis. *Blood* 71, 1-8 (1988).
  106. Bach, R. & Rifkin, D.B. Expression of tissue factor procoagulant activity: regulation by cytosolic calcium. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87, 6995-6999 (1990).
  107. Maynard, J.R., Heckman, C.A., Pitlick, F.A. & Nemerson, Y. Association of tissue factor activity with the surface of cultured cells. *J Clin Invest* 55, 814-824 (1975).
  108. Chen, K., Lin, Y. & Detwiler, T.C. Protein disulfide isomerase activity is released by activated platelets. *Blood* 79, 2226-2228 (1992).
  109. Essex, D.W., Li, M., Miller, A. & Feinman, R.D. Protein disulfide isomerase and sulfhydryl-dependent pathways in platelet activation. *Biochemistry* 40, 6070-6075 (2001).
  110. Hron, G., *et al.* Tissue factor-positive microparticles: cellular origin and association with coagulation activation in patients with colorectal cancer. *Thromb Haemost* 97, 119-123 (2007).
  111. Polgar, J., Matuskova, J. & Wagner, D.D. The P-selectin, tissue factor, coagulation triad. *J Thromb Haemost* 3, 1590-1596 (2005).
  112. Himber, J., Kling, D., Fallon, J.T., Nemerson, Y. & Riederer, M.A. In situ localization of tissue factor in human thrombi. *Blood* 99, 4249-4250 (2002).
  113. Lee, A., *et al.* Dose-response study of recombinant factor VIIa/tissue factor inhibitor recombinant nematode anticoagulant protein c2 in prevention of postoperative venous thromboembolism in patients undergoing total knee replacement. *Circulation* 104, 74-78 (2001).
  114. Day, S.M., *et al.* Macrovascular thrombosis is driven by tissue factor derived primarily from the blood vessel wall. *Blood* 105, 192-198 (2005).

115. Szalony, J.A., *et al.* Administration of a small molecule tissue factor/factor VIIa inhibitor in a non-human primate thrombosis model of venous thrombosis: effects on thrombus formation and bleeding time. *Thromb Res* 112, 167-174 (2003).
116. Falanga, A., Marchetti, M., Vignoli, A. & Balducci, D. Clotting mechanisms and cancer: implications in thrombus formation and tumor progression. *Clin Adv Hematol Oncol* 1, 673-678 (2003).
117. Falanga, A., Marchetti, M. & Vignoli, A. Coagulation and cancer: biological and clinical aspects. *J Thromb Haemost* (2012).
118. Falanga, A., Panova-Noeva, M. & Russo, L. Procoagulant mechanisms in tumour cells. *Best Pract Res Clin Haematol* 22, 49-60 (2009).
119. Horton, J. Venous thrombotic events in cancer: the bottom line. *Cancer Control* 12 Suppl 1, 31-37 (2005).
120. Lopez, J.A., Kearon, C. & Lee, A.Y. Deep venous thrombosis. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*, 439-456 (2004).
121. Langer, F. & Bokemeyer, C. Crosstalk between cancer and haemostasis. Implications for cancer biology and cancer-associated thrombosis with focus on tissue factor. *Hamostaseologie* 32, 95-104 (2012).
122. Kuderer, N.M., Ortel, T.L. & Francis, C.W. Impact of venous thromboembolism and anticoagulation on cancer and cancer survival. *J Clin Oncol* 27, 4902-4911 (2009).
123. Rickles, F.R. & Levine, M.N. Venous thromboembolism in malignancy and malignancy in venous thromboembolism. *Haemostasis* 28 Suppl 3, 43-49 (1998).
124. Blom, J.W., *et al.* Incidence of venous thrombosis in a large cohort of 66,329 cancer patients: results of a record linkage study. *J Thromb Haemost* 4, 529-535 (2006).
125. Heit, J.A., *et al.* Risk factors for deep vein thrombosis and pulmonary embolism: a population-based case-control study. *Arch Intern Med* 160, 809-815 (2000).
126. Ambrus, J.L., Ambrus, C.M., Pickern, J., Soldes, S. & Bross, I. Hematologic changes and thromboembolic complications in neoplastic disease and their relationship to metastasis. *J Med* 6, 433-458 (1975).
127. Blom, J.W., Osanto, S. & Rosendaal, F.R. High risk of venous thrombosis in patients with pancreatic cancer: a cohort study of 202 patients. *Eur J Cancer* 42, 410-414 (2006).
128. Levitan, N., *et al.* Rates of initial and recurrent thromboembolic disease among patients with malignancy versus those without malignancy. Risk analysis using Medicare claims data. *Medicine (Baltimore)* 78, 285-291

- (1999).
129. Khorana, A.A., Francis, C.W., Culakova, E., Kuderer, N.M. & Lyman, G.H. Thromboembolism is a leading cause of death in cancer patients receiving outpatient chemotherapy. *J Thromb Haemost* 5, 632-634 (2007).
  130. Dvorak, H.F., *et al.* Tumor shedding and coagulation. *Science* 212, 923-924 (1981).
  131. Callander, N.S., Varki, N. & Rao, L.V. Immunohistochemical identification of tissue factor in solid tumors. *Cancer* 70, 1194-1201 (1992).
  132. Davila, M., *et al.* Tissue factor-bearing microparticles derived from tumor cells: impact on coagulation activation. *J Thromb Haemost* 6, 1517-1524 (2008).
  133. Langer, F., *et al.* Plasma tissue factor antigen in localized prostate cancer: distribution, clinical significance and correlation with haemostatic activation markers. *Thromb Haemost* 97, 464-470 (2007).
  134. Zwicker, J.I., *et al.* Tumor-derived tissue factor-bearing microparticles are associated with venous thromboembolic events in malignancy. *Clin Cancer Res* 15, 6830-6840 (2009).
  135. Manly, D.A., *et al.* Increased microparticle tissue factor activity in cancer patients with Venous Thromboembolism. *Thromb Res* 125, 511-512 (2010).
  136. Khorana, A.A., *et al.* Tissue factor expression, angiogenesis, and thrombosis in pancreatic cancer. *Clin Cancer Res* 13, 2870-2875 (2007).
  137. van Doormaal, F., *et al.* Coagulation activation and microparticle-associated coagulant activity in cancer patients. An exploratory prospective study. *Thromb Haemost* 108, 160-165 (2012).
  138. Jackson Laboratory. JAX Mice Database - 000664 C57BL/6J. <http://jaxmice.jax.org/strain/000664.html> (Zugriff: 08.01.2013).
  139. Jackson Laboratory. JAX Mice Database - 002289 B6.129S7-Selp<tm1Bay>/J. <http://jaxmice.jax.org/strain/002289.html> (Zugriff: 08.01.2013).
  140. Bergmeier, W., *et al.* The role of platelet adhesion receptor GPIIb/IIIa far exceeds that of its main ligand, von Willebrand factor, in arterial thrombosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 16900-16905 (2006).
  141. Kanaji, T., Russell, S. & Ware, J. Amelioration of the macrothrombocytopenia associated with the murine Bernard-Soulier syndrome. *Blood* 100, 2102-2107 (2002).
  142. Clausen, B.E., Burkhardt, C., Reith, W., Renkawitz, R. & Forster, I.



- Conditional gene targeting in macrophages and granulocytes using LysMcre mice. *Transgenic Res* 8, 265-277 (1999).
143. Pawlinski, R., *et al.* Role of cardiac myocyte tissue factor in heart hemostasis. *J Thromb Haemost* 5, 1693-1700 (2007).
144. Redecha, P., *et al.* Tissue factor: a link between C5a and neutrophil activation in antiphospholipid antibody induced fetal injury. *Blood* 110, 2423-2431 (2007).
145. Versuchstierkunde, G.f. Tiergerechte Haltung: Labormäuse. [http://www.gv-solas.de/assets/files/PDFs/pdf\\_PUBLIKATION/hal\\_maushaltung.pdf](http://www.gv-solas.de/assets/files/PDFs/pdf_PUBLIKATION/hal_maushaltung.pdf) (Zugriff: 22.01.2013).
146. Morgan, R.T., *et al.* Human cell line (COLO 357) of metastatic pancreatic adenocarcinoma. *Int J Cancer* 25, 591-598 (1980).
147. Vezeridis, M.P., *et al.* In vivo selection of a highly metastatic cell line from a human pancreatic carcinoma in the nude mouse. *Cancer* 69, 2060-2063 (1992).
148. Bruns, C.J., Harbison, M.T., Kuniyasu, H., Eue, I. & Fidler, I.J. In vivo selection and characterization of metastatic variants from human pancreatic adenocarcinoma by using orthotopic implantation in nude mice. *Neoplasia* 1, 50-62 (1999).
149. Life Technologies. 5-(and-6)-Carboxy-2',7'-Dichlorofluorescein Diacetate (Carboxy-DCFDA), mixed isomers. <https://products.invitrogen.com/ivgn/product/C369?ICID=%3D%3D%3D%3D%3D%3D%3D%3Dsearch-product> (Zugriff: 09.01.2013).
150. Frey, H.-H. & Löscher, W. *Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie für die Veterinärmedizin*, (Enke Verlag, Stuttgart, 2007).
151. Emfret analytics. emfret ANALYTICS: Product Info and Order. [http://www.emfret.com/index.php?id=shop&no\\_cache=1&tx\\_feproducts\\_pi1%5Ba%5D=details&tx\\_feproducts\\_pi1%5BCatNo%5D=R300&cHash=39b5a055c2](http://www.emfret.com/index.php?id=shop&no_cache=1&tx_feproducts_pi1%5Ba%5D=details&tx_feproducts_pi1%5BCatNo%5D=R300&cHash=39b5a055c2) (Zugriff: 09.01.2013).
152. Daley, J.M., Thomay, A.A., Connolly, M.D., Reichner, J.S. & Albina, J.E. Use of Ly6G-specific monoclonal antibody to deplete neutrophils in mice. *J Leukoc Biol* 83, 64-70 (2008).
153. Mulisch, M. & Welsch, U. *Romeis-Mikroskopische Technik*, (Spektrum Akademischer Verlag, 2009).
154. Life Technologies. Acridine Orange, 1g. <http://products.invitrogen.com/ivgn/product/A1301?ICID=%3D%3D%3D%3D%3D%3D%3D%3Dsearch-product%2C+Zugriff%3A+20.04.2011>. (Zugriff: 09.01.2013).

155. Alkadhi, H. Wie funktioniert CT?: Eine Einführung in Physik, Funktionsweise und klinische Anwendungen der Computertomographie, (Springer-Verlag GmbH Berlin, Heidelberg, 2011).
156. Dietrich, C.F. Ultraschall-Kurs, (Deutscher Ärzte-Verlag, 2012).
157. Schneider, B. Äquivalenztests. <http://www.mh-hannover.de/fileadmin/institute/biometrie/Scripte/speziell/aequival1.pdf> (Zugriff: 02.02.2013).
158. Steinijans, V.W. & Diletti, E. Statistical analysis of bioavailability studies: parametric and nonparametric confidence intervals. *Eur J Clin Pharmacol* 24, 127-136 (1983).
159. Rosen, E.D., *et al.* Laser-induced noninvasive vascular injury models in mice generate platelet- and coagulation-dependent thrombi. *Am J Pathol* 158, 1613-1622 (2001).
160. Umemura, K., Wada, K., Uematsu, T. & Nakashima, M. Evaluation of the combination of a tissue-type plasminogen activator, SUN9216, and a thromboxane A2 receptor antagonist, vapiprost, in a rat middle cerebral artery thrombosis model. *Stroke* 24, 1077-1081; discussion 1081-1072 (1993).
161. Thaler, J., *et al.* Microparticle-associated tissue factor activity, venous thromboembolism and mortality in pancreatic, gastric, colorectal and brain cancer patients. *J Thromb Haemost* 10, 1363-1370 (2012).
162. Wang, J.G., *et al.* Tumor-derived tissue factor activates coagulation and enhances thrombosis in a mouse xenograft model of human pancreatic cancer. *Blood* 119, 5543-5552 (2012).
163. Mackman, N. Role of tissue factor in hemostasis and thrombosis. *Blood Cells Mol Dis* 36, 104-107 (2006).

## **XIII. ANHANG**

### **1. DANKSAGUNG**

Zuerst gilt mein Dank Herrn Prof. Dr. med. Steffen Massberg, der mir die Möglichkeit bot dieses interessante Thema unter seiner Leitung zu bearbeiten und für die kompetente wissenschaftliche Betreuung.

Herrn Prof. Dr. med. vet. Thomas Göbel danke ich für die Übernahme der Arbeit, deren Durchsicht und Einreichung an der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität, München.

Mein besonderer Dank gilt meiner Betreuerin Frau Dr. med. vet. Marie-Luise v. Brühl für die hervorragende Betreuung. Sie war zu jeder Zeit erreichbar und stand mir bei allen Fragen motivierend und beratend zur Seite.

Auch Herrn Dr. med. Konstantin Stark möchte ich für seine Unterstützung danken. Er hat mit seinem umfassenden Wissen und immer neuen Ideen das Fortschreiten des Projektes maßgeblich mit gefördert.

Desweiteren bedanke ich mich bei der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. med. Bernd Engelmann, insbesondere bei Frau Petra Vrabcova für die viele Arbeit, die sie in die Isolation der Mikropartikel investiert hat.

Auch Herrn Dr. med. vet. Alexander Steinhart, der mich in die Technik der venösen Stenose eingearbeitet hat, Frau Dr. med. vet. Sue Chandraratne für ihre Hilfestellung bei allen auftretenden Fragen und Herrn Tobias Schmidergall für die Unterstützung bei der Erstellung der Histologie möchte ich gesondert danken.

Ebenso gilt mein Dank Herrn PD Dr. med. vet. Reese, der mit viel Geduld und Interesse sowie durch Bereitstellung des Ultraschallgerätes die Erstellung der sonographischen Aufnahmen ermöglicht hat. Zudem danke ich ihm für die Hilfestellung bei der Auswertung der Statistik.

Bei Frau Iina Laitinen, PhD, von der Nuklearmedizinischen Klinik am Klinikum Rechts der Isar bedanke ich mich für die Ermöglichung der computertomographischen Untersuchungen.

Herzlichst bedanke ich mich bei der gesamten Arbeitsgruppe für die freundliche Aufnahme, die freundschaftliche Arbeitsatmosphäre sowie kompetente Hilfestellung und Unterstützung.

Bei Nicole Blount, Bastian Helmer und Lara Ullrich möchte ich mich für die kompetente, verantwortungsbewusste und zuverlässige Tierpflege bedanken.

Zuletzt gilt mein Dank meiner Familie, die mir das Studium ermöglicht und mir stets Rückhalt gegeben habe. Von Herzen danke ich meinem Partner, der immer an mich geglaubt, mich allzeit unterstützt und motiviert hat.